

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



LECHES FERMENTADAS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA: IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y EVALUACIÓN DE SU BIODISPONIBILIDAD



ANA QUIRÓS DEL BOSQUE

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

**LECHES FERMENTADAS CON
ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA:
IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y
EVALUACIÓN DE SU
BIODISPONIBILIDAD**

Memoria presentada por:

Ana Quirós del Bosque

Para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Isidra Recio Sánchez

Dra. Mercedes Ramos González

Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
Inst. Fermentaciones Industriales

**ISIDRA RECIO SANCHEZ, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE
FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC Y MERCEDES RAMOS
GONZÁLEZ, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE
FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC**

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado “Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: Identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad” y que constituye la Memoria que presenta la Ingeniera Ana Quirós del Bosque, para optar al grado de doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Y para que conste firmamos el presente certificado a 15 de Enero de 2007.

Fdo: Isidra Recio Sánchez

Fdo: Mercedes Ramos González

A mis padres, a mi hermano y a Santi

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, gracias a una beca con cargo a un contrato de investigación entre el CSIC y el grupo Leche Pascual, y a una beca I3P del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Mi reconocimiento al Instituto de Fermentaciones Industriales y a todo el equipo directivo, por los recursos técnicos y académicos puestos al alcance para mi formación académica y científica.

Quiero agradecer de manera muy especial a mis directoras de tesis, la Dra. Mercedes Ramos y la Dra. Isidra Recio, la posibilidad que me han brindado de iniciarme en la investigación, la confianza depositada en mí desde el primer día en que comencé este trabajo, y por supuesto, sus enseñanzas y orientaciones.

Mi más sincero agradecimiento a la directora del Instituto de Fermentaciones Industriales la Dra. Lourdes Amigo y al resto de doctores del departamento, Rosina López-Fandiño, Elena Molina, Josefina Belloque, Encarnación Puedo, Adolfo Martínez, Victoria Moreno y M^a Carmen Polo, por su disposición y por compartir conmigo su experiencia. Muchísimas gracias al Dr. Pedro J. Martín por su ayuda con la parte estadística de esta tesis.

Tengo que agradecer al Dr. Marco Antonio Delgado del departamento de Investigación y Desarrollo del grupo Leche Pascual, y a las Doctoras Amaya Aleixandre y Marta Miguel del Instituto de Farmacología y Toxicología del CSIC, su colaboración en la realización de este trabajo.

Estoy muy agradecida al Dr. Alberto Dávalos, del departamento de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal, por su ayuda en los experimentos con células y por supuesto por sus útiles consejos.

Gracias a Constanza Talavera por su apoyo técnico y su simpatía, así como al personal de secretaría y administración (Angelina, José Luis y Antonio).

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Ernesto Carvalho y a la Dra. Teresa Bertoldo, por permitirme trabajar en su laboratorio. A ellos y a todo el personal del CPQBA de la Universidad de Campinas de Brasil, muchísimas gracias por vuestra enorme acogida.

Muchísimas gracias a todos mis compañeros por el insuperable ambiente de trabajo. Quiero agradecer a los doctores José Ángel Gómez, Blanca Hernández, María Manso y Miriam del Pozo, su inestimable ayuda en todo momento. Gracias a Teresa, Virginia, Graci, Paqui, María del Mar, Patricia, y Mariché, por los buenos momentos en el laboratorio. Quiero agradecer de forma muy especial a Juanma, Carol, Irene, Yolanda, Miguel, Rosa e Iván, su apoyo incondicional y esas risas en los momentos de descanso. Además de compañeros son grandes amigos.

Esta tesis se la dedico a mis padres, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, por su comprensión y por estar siempre conmigo. También se la dedico a mi hermano David, que me anima en todo lo que hago y está ahí cuando le necesito.

Santi, este trabajo está dedicado a ti por apoyarme tanto y por hacerme tan increíblemente feliz.

Ana,
Enero 2007

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
LISTA DE ABREVIATURAS	13
OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	17
INTRODUCCIÓN GENERAL	23
1. Las proteínas lácteas como fuente de ingredientes funcionales	25
2. Leches fermentadas como alimentos funcionales	27
3. Péptidos derivados de proteínas alimentarias con actividad antihipertensiva	31
3.1. Péptidos con actividad IECA	33
3.2. Relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ECA	37
3.3. Estrategias para la producción de péptidos antihipertensivos	41
3.3.1. Fermentación	42
3.3.2. Hidrólisis con enzimas	49
3.4. Biodisponibilidad	52
3.5. Productos lácteos con efecto antihipertensivo	56
3.6. Estrategias para purificación e identificación de péptidos con actividad IECA	60
3.4.1. La espectrometría de masas aplicada a proteínas y péptidos lácteos	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Muestras	67
1.1. Leches fermentadas	67
1.1.1. Kefir	67
1.1.2. Leches fermentadas con <i>Enterococcus faecalis</i>	67
1.2. Leches humanas y fórmulas infantiles	68
2. Obtención de la fracción soluble	69
3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA	70
4. Determinación del contenido en proteína	71
4.1. Método Kjeldahl	71
4.2. Método del ácido bicinconínico	72
4.3. Método Dumas	72
5. RP-HPLC a escala semipreparativa	73
6. Identificación de péptidos mediante RP-HPLC-MS/MS	74

7. Identificación de péptidos mediante espectrometría de MS/MS	75
8. Síntesis de péptidos	76
9. Biodisponibilidad	77
9.1. Simulación gastrointestinal de péptidos sintéticos	77
9.2. Simulación gastrointestinal de leches humanas y fórmulas infantiles	78
9.3. Evaluación de la resistencia a las peptidasas del epitelio intestinal y de la absorción y mecanismo de Transporte de los péptidos LHLPLP y HLPLP	78
9.4. Resistencia del péptido LHLPLP a las peptidasas plasmáticas	81
9.5. Búsqueda en plasma del péptido LHLPLP tras su administración oral a SHR	82
10. Estudios enzimáticos del péptido LHLPLP	82
11. Estudios de estructura/actividad del péptido LHLPLP	83
12. Desarrollo de un método cuantitativo por RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS	83
13. Obtención del péptido antihipertensivo HLPLP mediante hidrólisis enzimática	85
14. Medida de la actividad antioxidante. Ensayo ABTS	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA EN KEFIR DE LECHE DE CABRA	91
2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA EN LECHE FERMENTADAS CON <i>E. faecalis</i>	103
2.1. Actividad inhibitoria de la ECA de leches fermentadas	103
2.2. Identificación de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA	105
2.3. Análisis cuantitativo del péptido LHLPLP	116
2.4. Biodisponibilidad	128
2.4.1. Simulación de la digestión gastrointestinal	128
2.4.2. Evaluación de la absorción intestinal y del mecanismo de transporte de los péptidos LHLPLP y HLPLP	133
2.4.3. Resistencia del péptido LHLPLP a las peptidasas plasmáticas	140
2.4.4. Búsqueda en plasma del péptido LHLPLP tras su administración oral a SHR	142
2.5. Estudios enzimáticos del péptidos LHLPLP	144
2.6. Estudios de relación estructura/actividad IECA del LHLPLP	146
2.7. Obtención del péptido antihipertensivo LHLPLP mediante hidrólisis enzimática	149

3. SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL DE LECHEs HUMANAS Y FÓRMULAS INFANTILES	156
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173

RESUMEN

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la identificación de nuevos péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), en leches fermentadas. Asimismo, se han realizado estudios de biodisponibilidad y se ha investigado sobre la producción de péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal de leche humana y fórmulas infantiles en los neonatos. Esta tesis se ha estructurado en tres partes.

En el primer apartado, se ha evaluado la actividad IECA en un kefir comercial de leche de cabra. Se han aislado e identificado los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) incluidos en el extracto soluble en agua del kefir. El aislamiento de los péptidos se ha realizado mediante dos etapas de cromatografía y posteriormente se han secuenciado por espectrometría de masas en tándem. Se ha realizado una simulación de la digestión gastrointestinal para evaluar la resistencia de los péptidos identificados a las enzimas digestivas o la formación de nuevos péptidos activos con actividad IECA. Los resultados mostraron que el kefir presentaba una actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina moderada. Se identificaron 16 péptidos, dos de los cuales con secuencias PYVRYL y LVYPFTGPIP, mostraron una potente actividad IECA. Tras la simulación de la digestión de los péptidos identificados, la actividad IECA fue similar o ligeramente inferior que la de los péptidos sin hidrolizar. Sin embargo, se pudo observar un aumento importante de la actividad tras la hidrólisis del péptido DKIHPPF.

En una segunda parte, se ha estudiado la actividad IECA de cuatro leches fermentadas con distintas cepas de *Enterococcus faecalis*, y se han identificado los péptidos responsables de su actividad. Además, se ha desarrollado un método mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem que permite la cuantificación de péptidos activos en leches fermentadas. También se han realizado estudios enzimáticos y de biodisponibilidad de los péptidos de interés. De este modo, se ha visto que las leches fermentadas con distintas cepas de *E. faecalis* presentan una alta capacidad para inhibir la ECA. Se han identificado 8 péptidos en

una leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727, siendo de especial interés fueron los fragmentos 58-76 y 133-138 de la β -caseína, con secuencias LVYPFPGPIPNSLPQNIPP y LHLPLP, que presentaron una potente actividad IECA. Los resultados sobre la evaluación de la biodisponibilidad mostraron que de las secuencias identificadas, el péptido LHLPLP fue el único que resistió la hidrólisis con las enzimas gastrointestinales. Mediante los estudios con células Caco-2 se pudo concluir que el LHLPLP es hidrolizado por las peptidasas celulares dando lugar al péptido HLPLP el cual se transporta a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la difusión pasiva por vía paracelular el principal mecanismo de transporte de este péptido. El HLPLP es resistente a las peptidasas plasmáticas humanas durante 4 horas en las condiciones ensayadas por lo que podría ser la forma activa del péptido LHLPLP. Sin embargo, ni el LHLPLP ni ninguno de sus fragmentos incluyendo el HLPLP se han podido encontrar en plasma de rata tras la administración del péptido.

En la tercera parte de esta tesis doctoral, se ha evaluado la actividad IECA y la actividad antioxidante en muestras de leche humana y en fórmulas infantiles tras una simulación de la digestión gastrointestinal. Tras la digestión la fracción peptídica procedente de la leche humana mostró una moderada actividad IECA comparada con las actividades encontradas en el permeado de las fórmulas infantiles. Se han identificado los péptidos producidos tras la simulación gastrointestinal de las muestras de leche humana, de especial interés fue el fragmento 125-129 de la β -caseína, HLPLP, que presentó una potente actividad para inhibir a la ECA. Esta secuencia se encuentra en una región de la β -caseína muy conservada entre las distintas especies de mamíferos, por lo que su liberación durante la digestión podría tener algún significado fisiológico. El fragmento β -caseína (154-160), WSVQPK, hallado también en las leches humanas tras la simulación gastrointestinal, mostró una potente actividad antioxidante.

SUMMARY

In this Thesis several novel peptides with angiotensin converting enzyme activity have been identified in fermented milks. Moreover, bioavailability studies and the release of bioactive peptides during gastrointestinal digestion of human milk and infant formulas have been carried out. This Thesis has been divided in three parts.

In the first part, angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity has been evaluated in a commercial kefir made from caprine milk. Isolation and identification of active peptides has been carried out in the 3000 Da water soluble extract of kefir. Isolation of the peptides has been performed by following two chromatographic steps and the peptides have been sequenced by tandem mass spectrometry. In order to evaluate the resistance of these peptides to digestive enzymes and the release of new active peptides, simulated gastrointestinal digestion of the identified peptides has been also carried out. The results showed that kefir possessed moderate angiotensin converting enzyme activity. Sixteen peptides were identified, two of these peptides with sequences, PYVRYL y LVYPFTGPIPN, presented potent ACE-inhibitory properties. After simulated gastrointestinal digestion of these peptides, the ACE-inhibitory activity was similar or slightly lower than that of the non-hydrolyzed peptides. However, a remarkable increase in this activity was observed upon hydrolysis of peptide DKIHFP.

In a second part, ACE-inhibitory activity has been studied in four milks fermented with different strains of *Enterococcus faecalis* and the peptides responsible of this activity have been identified. With the aim to quantify active peptides in the fermented milks, an HPLC coupled with tandem mass spectrometry method has been developed. Enzymatic and bioavailability studies of active peptides have been also performed. The results showed that fermented milks with different strains of *E. faecalis* possessed high capacity to inhibit ACE. Eight peptides were identified in a fermented milk with *E. faecalis* CECT 5727. Of special interest were fragments 58-76 and 133-138 of β -casein which presented a potent ACE-inhibitory activity. Bioavailability results showed that of identified sequences only the peptide LHLPLP was resistant to digestive enzymes. From the studies with Caco-2 cells, it was concluded that the peptide LHLPLP is

hydrolysed by brush border peptidases releasing the pentapeptide HLPLP, which is transported through Caco-2 monolayer by passive diffusion via paracellular route. The peptide HLPLP is resistant to human blood peptidases for 4 hours in the conditions assayed, and this sequence could be the active form of the peptide LHLPLP in the organism. However, neither LHLPLP or any of their fragments including the peptide HLPLP were found in rat plasma after peptide administration.

In the third part of this Thesis, the angiotensin converting enzyme and the antioxidant activity have been evaluated in human milk samples and infant formulas after simulated gastrointestinal digestion. The peptidic fraction from human milk after simulated gastrointestinal digestion showed moderate ACE-inhibitory activity compared to that found in the permeate of infant formulas. Of special interest was fragment 125-129 of β -casein, HLPLP, which was found in human milk samples subjected to simulated gastrointestinal digestion. This peptide presented potent ACE-inhibitory activity. This region of the β -casein molecule is highly preserved between different mammalian species thus its releasing during digestion could have a physiological significance. The fragment 154-160 of β -casein, WSVPQPK, which was also found in hydrolysed human milk samples showed potent antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS:	2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] sal de diamonio
CECT:	Colección Española de Cultivos Tipo
C-terminal:	Carboxilo terminal
ECA:	Enzima Convertidora de Angiotensina
ESI-MS:	Espectrometría de masas con fuente de ionización de electrospray
HPLC:	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
IC₅₀:	Concentración necesaria de un compuesto para inhibir el 50% de actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IECA:	Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina
MALDI-TOF:	Espectrometría de masas con fuente de ionización de desorción mediante laser inducida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
MS:	Espectro de masas
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
N-terminal:	Amino terminal
PAS:	Presión arterial sistólica
PAD:	Presión arterial diastólica
QSAR:	Modelos de relación estructura-actividad cuantitativos
RP-HPLC:	Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa
RP-HPLC-MS/MS:	Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem
SHR:	Ratas espontáneamente hipertensas
TEAC:	Capacidad antioxidante equivalente al trolox
WSE:	Extracto soluble en agua

Los diferentes aminoácidos se nombraron con el código de tres letras cuando aparecían de manera individual y con el código de una letra cuando se encontraban en el interior de una secuencia peptídica

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVO GENERAL Y PLAN DE TRABAJO

El yogur y las leches fermentadas presentan una serie de propiedades beneficiosas para la salud las cuales se pueden atribuir al uso de los microorganismos que se emplean en su elaboración, y a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación, tales como metabolitos, iones y moléculas biológicamente activas. Se sabe que los sistemas proteolíticos de ciertas bacterias son capaces de liberar al medio péptidos a partir de las proteínas lácteas. Algunos fragmentos proteicos, si bien se encuentran en estado inactivo dentro de la proteína precursora, una vez liberados mediante hidrólisis pueden ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo. Estos péptidos se han denominado péptidos bioactivos o péptidos funcionales.

Se han descrito péptidos derivados de proteínas alimentarias con diferentes actividades biológicas: opiácea, antitrombótica, inmunomodulante, etc. Entre éstos, cabe destacar los péptidos con actividad antihipertensiva, dada la elevada incidencia de enfermedades coronarias en la población y siendo el tratamiento de la hipertensión una de las estrategias más utilizadas para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. La mayor parte de los péptidos con actividad antihipertensiva derivados de proteínas alimentarias actúan inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Cabe destacar que en la mayoría de las fermentaciones lácteas no se generan péptidos con inhibidores de la ECA, sin embargo, algunos de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA (IECA) y antihipertensiva más potentes identificados en proteínas alimentarias, fueron aislados por el grupo del Dr. Yamamoto en una leche fermentada con *Lb. helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae*.

El objetivo general del presente trabajo fue la búsqueda e identificación de nuevos péptidos con actividad IECA y antihipertensiva en leches fermentadas tipo kefir y en leches fermentadas con distintas cepas de *Enterococcus faecalis*. También se llevaron a cabo estudios de biodisponibilidad de los péptidos mediante una serie de modelos *in vitro* y se desarrolló un método cuantitativo por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (**RP-HPLC-MS/MS**) para poder determinar la cantidad de péptidos activos en leches fermentadas. Asimismo, se investigó sobre la

producción de péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal de leche humana y fórmulas infantiles en los neonatos.

Para llevar a cabo este objetivo se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

- **Aislamiento, identificación y actividad de péptidos inhibidores de la ECA en Kefir de leche de cabra. Simulación de la digestión gastrointestinal para evaluar la resistencia de los péptidos identificados a las enzimas digestivas o la formación de nuevos péptidos con actividad.**
- **Estudio de la actividad IECA de leches fermentadas con *Enterococcus faecalis* y aislamiento e identificación de los péptidos responsables de su actividad.**
- **Desarrollo un método cuantitativo por RP-HPLC-MS/MS para determinar de forma rutinaria el péptido antihipertensivo LHLPLP en leches fermentadas, con el mínimo tratamiento o prefraccionamiento de la muestra. Aplicación del método a distintos productos fermentados obtenidos mediante la utilización de *E. faecalis* y diferentes condiciones de fermentación.**
- **Estudios *in vitro* para evaluar la biodisponibilidad del péptido LHLPLP, mediante ensayos de simulación de la digestión gastrointestinal con enzimas digestivas, ensayos de absorción intestinal mediante con cultivos celulares y evaluación de la resistencia de los péptidos a las peptidasas sanguíneas mediante la realización de ensayos con plasma.**
- **Obtención del péptido HLPLP mediante hidrólisis enzimática.**

- **Estudio de la influencia de la digestión gastrointestinal en el perfil peptídico de muestras de leche humana y comparación con el perfil peptídico obtenido tras la digestión de varias muestras de fórmulas infantiles, evaluándose la producción de secuencias biológicamente activas o precursores de las mismas.**

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Las proteínas lácteas como fuente de ingredientes funcionales

Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de su efecto nutritivo, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad (Diplock et al., 1990). Esta definición es la que propone el FUFOS (Functional Food Science in Europe), y en ella cabe destacar tres aspectos importantes: (1) el efecto funcional es distinto al nutritivo, (2) debe demostrarse satisfactoriamente y (3) puede consistir en una mejoría de las funciones fisiológicas (incluyendo funciones psicológicas como el bienestar) o en reducción del riesgo de desarrollar un proceso patológico. El concepto de alimento funcional surgió en Japón en la década de los 80 debido a la necesidad de mejorar la calidad de vida de una población cada vez más envejecida que generaba altos costes sanitarios (Arai, S. 1996). Actualmente, y debido a la creciente preocupación de los consumidores por el binomio alimentación y salud, el mercado de los alimentos funcionales es un sector que se encuentra en continua expansión.

La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de una alta calidad nutricional. Además de su elevado valor nutritivo, en los últimos años se ha visto que algunas de estas proteínas o péptidos derivados de las mismas presentan diversas actividades fisiológicas y por lo tanto son muy interesantes desde el punto de vista tecnológico ya que pueden emplearse como ingredientes para desarrollar nuevos alimentos funcionales. Especialmente, el suero de quesería, un subproducto de la industria láctea, es un suplemento proteico muy popular en distintos alimentos funcionales (Recio y López-Fandiño, 2005). Las proteínas del suero lácteo son un grupo heterogéneo de proteínas a las cuales se les atribuyen distintas actividades biológicas. Entre estas se encuentran las inmunoglobulinas que confieren beneficios al sistema inmune, la lactoferrina que presenta actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica y antiviral, y la lactoperoxidasa que presenta actividad antibacteriana. Los

concentrados proteicos o proteínas derivadas de suero lácteo han mostrado diversas actividades biológicas *in vivo*: actividad anticancerígena, actividad antivírica (hepatitis, HIV), efectos en la composición corporal y beneficios en el tracto intestinal de lactantes. Además, en los últimos años se ha visto que determinados fragmentos de las proteínas alimentarias, una vez liberadas de su secuencia por hidrólisis pueden exhibir actividades biológicas. La leche y los productos lácteos se han mostrado como una fuente muy rica de estos péptidos, lo que ha suscitado gran interés por parte de la industria láctea cuyo reto es el desarrollo de tecnologías adecuadas que permitan la producción a gran escala de los péptidos bioactivos.

La “alimentación personalizada” es un nuevo concepto de nutrición que se basa en la atención a las necesidades nutricionales de cada individuo según su edad, estado físico, enfermedades, etc. La mayoría de los péptidos bioactivos no se absorben en el tracto gastrointestinal, ejerciendo una función directa en el lumen intestinal o bien mediante la interacción con receptores que se encuentran en la pared del intestino. Algunos de estos receptores podrían estar implicados en determinadas enfermedades como el cáncer, diabetes, osteoporosis, stress, obesidad o afecciones cardiovasculares. De esta manera los péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas entran dentro del nuevo concepto de “nutrición personalizada” y abren un abanico de posibilidades dentro del mercado de los alimentos funcionales (Korhonen y Philänto, 2006).

La leche humana es probablemente el primer alimento funcional que uno consume y constituye el alimento esencial para el recién nacido durante los primeros meses de vida. La alimentación con leche materna proporciona multitud de beneficios para la salud, el crecimiento y el desarrollo del individuo, y reduce el riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas en el futuro (Anonymous, 2005). Estos efectos beneficiosos que se le atribuyen a la leche humana, tienen su origen en muchos de sus componentes, y entre ellos las proteínas juegan un papel fundamental. Estas proteínas presentan diversas actividades biológicas que se han demostrado *in vitro*, en modelos animales y en estudios con humanos (Lönnerdal, 2003; 2004). Entre las actividades biológicas que se atribuye a las proteínas de la leche humana se encuentran: un

aumento en la absorción de nutrientes, la inhibición de enzimas, actividades enzimáticas, estimulación del crecimiento, modulación del sistema inmune y defensa contra patógenos (German y col., 2002). Además, recientemente se ha visto que la digestión de las proteínas de la leche humana puede liberar al medio péptidos bioactivos que podrían ser responsables en parte de las propiedades beneficiosas de la leche. Mediante la hidrólisis de las caseínas y las proteínas del suero humanas con enzimas gástricas y pancreatina se han obtenido péptidos con actividad opiácea (Brantl, 1984), inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (**ECA**) (Kim y col., 1993), antitrombótica e inmunomodulante (Fiat y col., 1993). El péptido lactoferrina, procedente de la hidrólisis con pepsina de la lactoferrina humana, presenta una potente actividad antimicrobiana con un amplio espectro de acción (Bellamy y col., 1992). La identificación de estas moléculas bioactivas y de sus efectos en la salud es un hoy en día un reto para genómica y para la proteómica.

A partir de la leche procedente de distintas especies de mamíferos se pueden obtener una gran variedad de péptidos. Sin embargo, estos péptidos van a ser distintos debido a diferencias cualitativas y cuantitativas entre las proteínas lácteas de las distintas especies. En una misma especie también puede haber variaciones dependiendo de la alimentación, el estado de lactación e incluso de los ciclos circadianos (Britton y Kastin, 1991). Por último, la utilización de determinados fermentos o enzimas es fundamental a la hora de promover la liberación de ciertos péptidos. A pesar de estas diferencias, existen regiones de las proteínas lácteas que presentan una gran homología entre distintas especies. Se ha postulado que la presencia de determinados péptidos bioactivos en estas regiones no es casual y que podría tener un significado fisiológico (Kohmura y col., 1989).

2. Leches fermentadas como alimentos funcionales

El yogur y las leches fermentadas presentan una serie de propiedades beneficiosas para la salud que les hace considerarse como alimentos funcionales, a la vez que contienen multitud de ingredientes funcionales para la formulación de otros alimentos. Además, estos productos lácteos son un vehículo excelente para la inclusión de otros

ingredientes funcionales de origen lácteo o no lácteo, como por ejemplo bacterias probióticas, carbohidratos prebióticos, fibra alimentaria, compuestos antioxidantes, etc. (Recio y López-Fandiño, 2005).

Los alimentos fermentados han sido consumidos desde los tiempos más antiguos. Aunque sus beneficios eran conocidos empíricamente, no fue hasta principios del siglo XX cuando los estudios del microbiólogo ruso Ilya Metchnikoff, por los cuales recibió el premio nobel de medicina en el año 1908, pusieron de manifiesto los efectos positivos que el consumo de yogur tenía para la salud humana. En su libro, "The prolongation of life", estableció la importancia del consumo de alimentos fermentados para contrarrestar la microflora nociva responsable de la producción de metabolitos indeseables o procarcinogénicos en el intestino.

Las propiedades beneficiosas de las leches fermentadas se pueden atribuir a los microorganismos que se emplean en su elaboración, y a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación, tales como metabolitos, iones y moléculas biológicamente activas. Los microorganismos contribuyen a la seguridad bacteriológica del producto y le confieren una serie de características desde el punto de vista organoléptico, tecnológico y nutricional. Además de aumentar la biodisponibilidad de la lactosa y de las proteínas y producir un enriquecimiento de ciertas vitaminas del grupo B, determinados microorganismos, en particular algunas bacterias ácido lácticas, como lactobacilos, bifidobacterias y los estreptococos, presentan efectos probióticos en el organismo (Leroy y De Vuyst, 2004). Los probióticos, se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que pueden ser agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana del intestino. Sus efectos beneficiosos han sido descritos en algunas patologías, especialmente en las diarreas, ciertos tumores y alergias (Fulier, R. 1989).

Las fermentaciones con bacterias ácido lácticas se hallan a veces asociadas a fermentaciones con otro tipo de microorganismos, tales como levaduras y mohos. Un ejemplo de esto es el kefir, una de las más antiguas leches fermentadas originaria de los montes del Cáucaso. La fermentación se lleva a cabo con los "granos de kefir", los

cuales contienen una microflora variada compuesta de bacterias ácido lácticas y levaduras, que junto con el polisacárido kefirán, forman una comunidad simbiótica que confieren propiedades únicas a esta bebida (Beshkova y col., 2002). De hecho, tanto el kefir, como los granos de kefir, y el kefirán, han sido objeto de numerosos estudios científicos para demostrar su efecto beneficioso en animales y en humanos. Entre las actividades biológicas que se han descrito se encuentran: actividad inmunomodulante y antitumoral en animales, actividad antioxidante al reducir la peroxidación de lípidos, un efecto antidiabético, propiedades antibacterianas y antifúngicas, y efecto prebiótico y probiótico (Farnworth and Mainville, 2003). Además varios estudios llevados a cabo en humanos muestran que el consumo de kefir ayuda a reducir los niveles de colesterol (Vujicic y col., 1992), y puede emplearse como alternativa al yogur para aumentar la digestibilidad de la lactosa (Hertzler y Clancy, 2003).

Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de obtener energía de la lactosa y de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos al medio. Su capacidad proteolítica ha sido tradicionalmente explotada porque los aminoácidos y péptidos que se forman durante la fermentación contribuyen o son precursores de otras sustancias que influyen en el aroma, el sabor y la textura de estos productos (Visser, 1993).

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas es muy complejo y bastante específico e implica la acción concertada de proteinasas y peptidasas en la hidrólisis de las proteínas lácteas hasta el nivel de aminoácidos (**Figura 1**). Con respecto a la función que desempeñan los componentes del sistema proteolítico se pueden dividir en tres grupos (Thomas y Pritchard, 1987): 1) una proteinasa extracelular unida a la membrana plasmática que cataliza la formación de oligopéptidos por degradación directa de la caseína, 2) en la membrana de las bacterias lácticas existen sistemas de transporte específicos para aminoácidos, di-, tri-péptidos y oligopéptidos de hasta 18 residuos a través de la membrana celular, y 3) un sistema de distintas peptidasas intracelulares que son las responsables últimas de la degradación de los péptidos más largos que no se transportan al interior de la célula. En los últimos años se ha visto que los sistemas proteolíticos de ciertas bacterias son capaces de liberar al medio péptidos bioactivos a partir de las proteínas lácteas (Gobbeti y col., 2002).

Los péptidos bioactivos pueden ejercer sus funciones mediante diversos mecanismos. Algunos actúan uniéndose a determinados receptores, otros son inhibidores de enzimas, otros regulan la absorción intestinal, etc. Además, los péptidos derivados de proteínas alimentarias a diferencia de los péptidos bioactivos endógenos pueden presentar propiedades multifuncionales. Este es el caso del péptido β -lactorfina, YLLF, derivado de la β -lactoglobulina, que posee actividad opiácea y además presenta actividad inhibitoria de la ECA (**IECA**) (Mullally y col., 1996).

A partir de productos lácteos fermentados se han aislado numerosos péptidos o precursores de los mismos, y fracciones peptídicas con propiedades bioactivas. Se han descrito péptidos con actividad inmunomodulante (LeBlanc y col., 2002), anticancerígena (LeBlanc y col., 2005), hipocolesterolemica (Kawase y col., 2000), antimicrobiana (Hernández y col., 2005), quelante de minerales (Lorenzen and Meisel, 2005), opiácea (Rokka y col., 1997), antioxidante (Hernández-Ledesma y col., 2005), etc. De todos éstos, los péptidos bioactivos que han sido más estudiados hasta el momento son aquellos implicados en el control de la presión arterial.

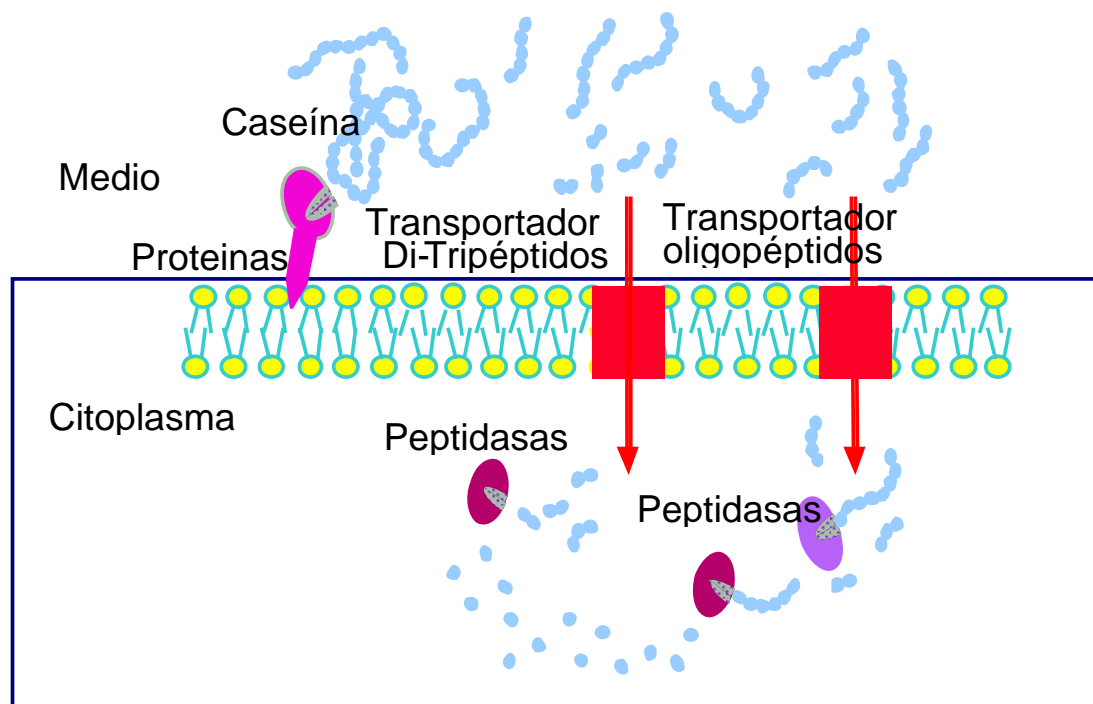


Figura 1. Sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* (Foucaud y col., 1995).

3. Péptidos derivados de proteínas lácteas con actividad antihipertensiva

La hipertensión es una enfermedad muy común en los países desarrollados que afecta aproximadamente a un tercio de la población y genera unos gastos sanitarios elevadísimos. En USA los costes de los fármacos que se emplean para el tratamiento de la hipertensión y patologías asociadas ascendieron a unos 15 billones de dólares en el año 2004. Una reducción de la presión arterial reduce mucho el riesgo de padecer enfermedades coronarias, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal e ictus. Se estima que por cada 5 mm Hg de reducción en la presión diastólica, el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular podría reducirse en un 16% (Collins y col., 1990).

La presión sanguínea del cuerpo humano está regulada por varias rutas bioquímicas. Tradicionalmente, su control se ha asociado con el sistema renina-angiotensina, pero la generación de sustancias vasoregulatoras también se produce por otras vías como son el sistema quinina-caliceína, el sistema de la endopeptidasa neutral y el sistema de la enzima convertidora de endotelina. A través de estos sistemas se producen una serie de péptidos, que junto con el balance de fluidos y electrolitos en el organismo, regulan la presión arterial (FitzGerald y col., 2004).

Se han descrito distintos mecanismos mediante los cuales los péptidos derivados de proteínas lácteas pueden disminuir la presión arterial. Uno de ellos es mediante la interacción con receptores opiáceos, como es el caso del tetrapéptido YGLF, α -lactorfina, derivado de la α -lactoalbúmina. Este péptido disminuyó la tensión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (**SHR**) y en ratas normotensas Wistar-Kyoto cuando se les suministró por vía subcutánea (Nurminen y col., 2000). Posteriormente, se demostró que la α -lactorfina producía una relajación endotelio dependiente de las arterias mesentéricas de SHR que no se observaba cuando se suministraba un inhibidor de la de la sintasa del óxido nítrico. Se propuso así un mecanismo de acción que consistiría en la estimulación de los receptores opiáceos periféricos con la consiguiente liberación de óxido nítrico, que provocaría una vasodilatación (Sipola y col., 2002). Las investigaciones sobre los efectos de la α -lactorfina en ratones,

muestran que este péptido no produce efectos secundarios en la actividad y la coordinación motora, temperatura rectal y otros efectos típicos que sí se presentan con otras sustancias opiáceas tales como la morfina (Ijäs y col., 2004).

Otro mecanismo por el cual los péptidos pueden disminuir la presión arterial es gracias a la capacidad de ciertas secuencias aminoacídicas para quelar minerales. Son los denominados fosfopéptidos, que pueden formar sales solubles de fosfato y facilitar la absorción del calcio al impedir su precipitación en el intestino. El consumo de una dieta rica en calcio ha sido relacionado con una disminución de la presión arterial (Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2000).

Existen evidencias científicas que indican que el estrés oxidativo y consecuente daño oxidativo de las células son inductores de patologías cardiovasculares, y que por tanto, una actividad antioxidante podría ser la responsable de un efecto hipotensor (Touyz, 2004). Así, se ha visto que en pacientes hipertensos de edad avanzada el tratamiento crónico con ácido ascórbico reduce considerablemente la presión arterial sistólica (Sato y col., 2006). Se ha postulado que la actividad antioxidante que presentan algunos péptidos antihipertensivos, podría ser el mecanismo a través del cual estos péptidos disminuyen la presión arterial (Miguel y col., 2004). Sería necesario realizar más estudios que confirmen esta hipótesis, y que demuestren si realmente los péptidos antioxidantes pueden disminuir la tensión arterial.

El efecto antihipertensivo de los péptidos mediante la inhibición de la enzima ECA es uno de los mecanismos más estudiados. Algunos de los fármacos cuyo uso está muy extendido en el tratamiento de la hipertensión, tales como el captopril, enapril, alecepril y lisinopril, actúan mediante este mecanismo.

3.1. Péptidos con actividad IECA

La ECA [EC 3.4.15.1] es uno de los componentes principales del sistema renina angiotensina, y juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial en el organismo. La ECA aumenta la presión sanguínea al catalizar la conversión del decapeptido angiotensina I en el octapéptido angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor (Skeggs y col., 1956). Además la ECA también actúa en el sistema quinina-caliceína catalizando la degradación del nonapéptido vasodilatador bradiquinina. Los inhibidores de la ECA reducen la formación de la angiotensina II y la degradación de la bradiquinina, disminuyendo así la vasoconstricción de las arterias y produciendo por tanto un efecto hipotensor (**Figura 2**).

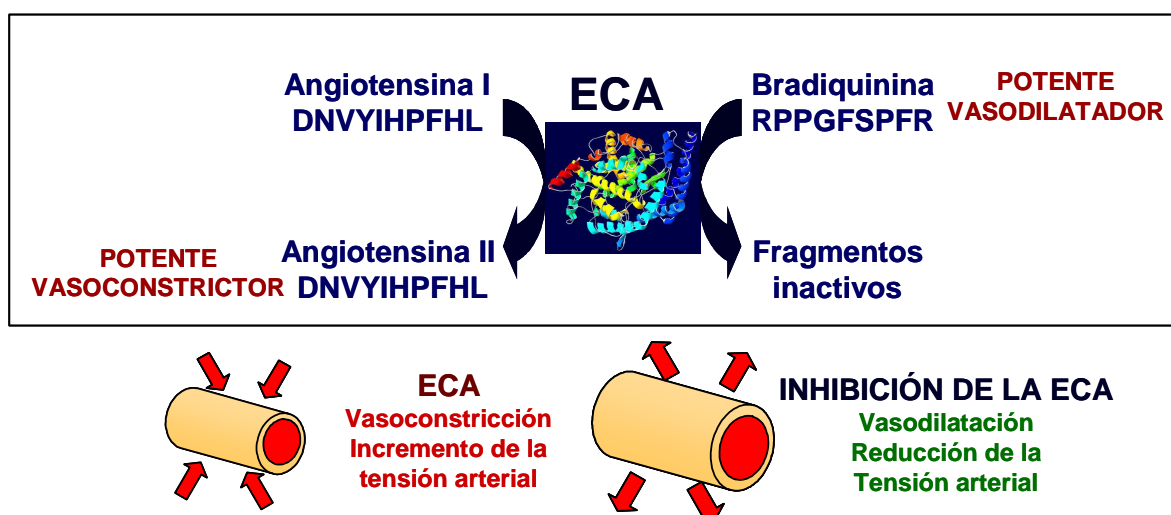


Figura 2. Reacciones catalizadas por la ECA.

En los últimos años distintas investigaciones han puesto de manifiesto la capacidad de ciertos péptidos formados como consecuencia de la proteólisis de las proteínas alimentarias para inhibir a la ECA. Estos péptidos son agentes potenciales para el tratamiento de la hipertensión y pueden emplearse como ingredientes para el desarrollo de nuevos productos funcionales, como suplementos dietéticos o para el desarrollo de nuevos fármacos. El gran interés que existe en el estudio de los péptidos inhibidores de la ECA queda reflejado en la gran cantidad de trabajos publicados sobre el tema durante la última década. Las revisiones más recientes han sido realizadas por López-

Fandiño y col., 2006; FitzGerald y Murray, 2006; Korhonen y Pihlanto, 2006; Silva y Malcata, 2005; Meisel, 2005, FitzGerald y col., 2004, Vermeirssen y col., 2004, Gobbetti y col., 2004.

Los primeros péptidos inhibidores de la ECA fueron identificados en el veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* (Ferreira y col., 1970; Ondetti y col., 1971), y desde entonces se han identificado numerosos péptidos con actividad IECA *in vitro* y/o con actividad antihipertensiva demostrada *in vivo*, en proteínas de distintos productos alimentarios. Se han identificado secuencias activas tanto en proteínas de origen animal: proteínas de plasma bovino (Lee y Song, 2003), proteínas de huevo (Miguel y col., 2004; Fujita y col., 1995), proteínas de bonito (Matsumura y col., 1993), como en proteínas de origen vegetal: proteínas de soja (Wu y Ding, 2001), proteínas de vino (Takayanagi y Yokotsuka, 1999), de maíz (Miyoshi y col., 1991). Sin embargo, hasta el momento son las proteínas lácteas la mayor fuente de péptidos inhibidores de la ECA.

Muchos de los inhibidores de la ECA se han aislado a partir de hidrolizados enzimáticos de las caseínas (Maruyama y col., 1987; Murayama y col., 1982), son las denominadas casokininas (Meisel, 1993). Las caseínas son las proteínas más abundantes de la leche y tienen una estructura abierta y flexible que las hace muy susceptibles a la proteólisis.

Los estudios de péptidos con actividad IECA en las proteínas del suero, denominado lactokininas, están más limitados debido a la estructura rígida que presenta la β -lactoglobulina, proteína mayoritaria en el lactosuero, que la hace resistente a las enzimas digestivas. Sin embargo, también se han identificado fragmentos de proteínas activos en hidrolizados de proteínas de suero (Hernández-Ledesma y col., 2002; Hernández-Ledesma y col., 2006; Pihlanto-Leppälä, 2001; FitzGerald y Meisel, 1999; Mullally y col., 1997).

Ensayos in vitro

Existen varios métodos para medir la actividad IECA *in vitro* que se emplean para seleccionar potenciales sustancias con actividad antihipertensiva *in vivo*. La mayoría de estos estudios utilizan el péptido sintético Hipuril-Histidil-Leucina que al ser incubado con la ECA produce ácido hipúrico y el dipéptido His-Leu, siendo estos productos de la reacción posteriormente cuantificados por diversos métodos colorimétricos (Matsui y col., 1992; Chang y col., 2001), fluorimétricos (Friedland y Silverstein, 1976), por electroforesis capilar (Shihabi., 1999; Chang y col., 2001), por cromatografía de líquidos de alta eficacia (**HPLC**) (Shalaby y col., 2006), etc.

Uno de los métodos más empleados para medir actividad IECA es el desarrollado por Cushman y Cheung (1971), que se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico que se forma al incubarse el sustrato Hipuril-Histidil-Leucina con la ECA en presencia de sustancias inhibitoras. Este método consta de varias etapas que incluyen la extracción con ácido hipúrico, evaporación, disolución en agua y medida de la absorbancia del ácido hipúrico a 228 nm. Más recientemente, se han puesto a punto otros procedimientos que no requieren una etapa previa de extracción del ácido hipúrico. Por ejemplo, Li y col., (2005), determinan directamente la cantidad de ácido hipúrico que se forma en la mezcla de reacción mediante una reacción colorimétrica. Otro método espectrofotométrico bastante utilizado es el desarrollado por Vermeirssen y col., 2002a, que utiliza como sustrato el tripéptido modificado furanacryloyl-Phe-Gly-Gly y como enzima un extracto obtenido con acetona a partir de pulmón de conejo, lo cual reduce mucho los costes del ensayo. También ha sido publicado un método analítico que se basa en el acoplamiento simultáneo de HPLC con un ensayo bioquímico para medir la actividad IECA y con un detector de masas que permite la identificación de los péptidos inhibidores de la enzima (Van Elswijk y col., 2003). Este método proporciona de forma rápida información química y biológica de la muestra que se está analizando, sin embargo para su realización se requiere un equipamiento complejo y bastante caro. El método de fluorescencia desarrollado por Sentandreu y Toldrá, 2006, emplea como sustrato de la ECA el compuesto *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitrophenylalanylproline, y la medida del producto de la reacción, el grupo fluorescente

o-aminobenzoylglycine, se realiza en un fluorímetro para placas multipocillo. Este nuevo método de fluorescencia no requiere una etapa previa de extracción del producto de reacción y presenta una gran ventaja respecto a los anteriores, ya que permite determinar la actividad IECA de un gran número de muestras en muy poco tiempo.

La actividad IECA puede variar dependiendo del método que se esté utilizando, debido a la utilización de sustratos diferentes, o en un mismo método si las condiciones son distintas o se emplea ECA de distintos orígenes. Existe por tanto, una necesidad de estandarizar las metodologías para determinar la actividad IECA *in vitro*, en concreto es importante alcanzar niveles de actividad de la ECA similares para que los valores obtenidos sean comparables y reproducibles (Murray y col., 2004).

La actividad IECA se calcula normalmente con el valor del IC₅₀ (concentración necesaria de sustancia inhibitoria para inhibir el 50% de actuación de la ECA). Valores del IC₅₀ bajos se traducen en una potente actividad IECA ya que es necesaria una concentración muy pequeña de sustancia inhibitoria para disminuir la actuación de la enzima.

Ensayos in vivo

Para determinar el efecto antihipertensivo *in vivo* de la ECA se utilizan normalmente ratas SHR como modelo de hipertensión humana esencial. Además, en muchos estudios, con el objeto de comprobar que los inhibidores de la ECA no modifican la presión arterial de sujetos no hipertensos, se emplean las ratas Wistar-Kyoto como control normotenso de las SHR (López-Fandiño y col., 2006). Estos experimentos con ratas constituyen una etapa previa a la realización de ensayos clínicos con humanos.

Los experimentos *in vivo* son muy importantes a la hora de evaluar la bioactividad de los péptidos inhibidores de la ECA, ya que éstos pueden sufrir transformaciones fisiológicas que conlleven a la pérdida de su actividad. Además, péptidos que en

principio no poseen una alta eficacia para inhibir a la enzima *in vitro* podrían dar lugar a fragmentos activos en el organismo y disminuir por tanto la presión arterial. A modo de ejemplo tenemos el péptido YKVPQL que fue identificado en un hidrolizado de caseínas con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790. Este péptido que presentó una alta capacidad IECA (IC_{50} de 22 μ M), *in vivo* no mostró efecto antihipertensivo (Maeno y col., 1996), probablemente como consecuencia de la degradación del péptido a fragmentos inactivos durante el proceso de digestión (FitzGerald y col., 2004). En este mismo hidrolizado se purificó e identificó otra secuencia peptídica KVLVPVQ que al contrario que en el caso anterior poseía una baja capacidad IECA *in vitro* ($IC_{50} > 1000\mu$ M), pero *in vivo* mostraba un potente efecto antihipertensivo. Se comprobó que esto se debía a que tras la digestión pancreática se liberaba el aminoácido Glu formándose el péptido KVLVPV el cual era el responsable de la actividad antihipertensiva, además este fragmento mostraba una potente actividad IECA *in vitro* con un IC_{50} de tan sólo 5 μ M.

También se han descrito péptidos cuya actividad IECA *in vitro* es baja y presentan actividad antihipertensiva *in vivo*, debido a que ejercen una acción hipotensora por un mecanismo distinto al de la inhibición de la ECA. Un ejemplo es el péptido YP, cuya capacidad de inhibir a la ECA *in vitro* es muy baja (IC_{50} es de 720 μ M), pero que *in vivo* disminuye la tensión arterial significativamente (Yamamoto y col., 1999).

3.2. Relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ECA

Ondetti y col., 1977, propusieron un modelo para establecer la interacción de los sustratos o inhibidores competitivos con el centro activo de la ECA. Uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipertensión, el inhibidor de la ECA captopril se diseñó en base a este modelo. Posteriormente, el modelo se revisó y se empleó para el diseño de varios potentes inhibidores de la enzima (Ondetti y Cushman., 1982; Cushman y col., 1982; Cushman y Ondetti., 1991). En este modelo se propone que el centro activo de la ECA está constituido por tres subunidades que pueden interaccionar potencialmente con los aminoácidos de los sustratos o inhibidores

también favorece la unión con la enzima (FitzGerald, Murray y Walsh., 2004; Gómez-Ruiz y col., 2004a; Kim y col., 2001).

Recientemente, se han empleado modernas técnicas bioinformáticas para poder establecer los requisitos estructurales que deben presentar los péptidos inhibidores de la ECA, son los denominados modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (**QSAR**). Estos estudios informáticos, son herramientas muy útiles que permiten predecir la actividad biológica de un determinado compuesto en relación con su estructura química. Así, mediante un modelo QSAR para péptidos de hasta 6 aminoácidos derivados de proteínas lácteas, se pudo concluir que había una relación entre la actividad IECA y la presencia de un aminoácido hidrofóbico o cargado positivamente en la última posición de la secuencia, sin embargo, no se encontró ninguna relación entre la estructura del extremo amino terminal (**N-terminal**) y la actividad (Pripp y col., 2004). Los resultados de otro estudio QSAR para la predicción de la actividad IECA de di- y tri-péptidos derivados de proteínas alimentarias, muestran que dipéptidos con aminoácidos con cadenas hidrofóbicas y tripéptidos con un aminoácido aromático en el extremo C-terminal, un residuo cargado positivamente en posición intermedia y un aminoácido hidrofóbico en el extremo N-terminal, pueden ser potenciales inhibidores de la ECA (Wu et al., 2006).

La longitud de la secuencia peptídica, así como la naturaleza de sus aminoácidos también van a determinar la actividad final. De este modo, péptidos que presentan el tripéptido C-terminal idéntico, poseen una actividad IECA muy diferente entre sí. Un ejemplo son los péptidos VRYL y VPSERYL, ambos identificados en un queso Manchego. Estos péptidos presentaban el mismo tripéptido C-terminal y sin embargo al evaluar su actividad IECA el primero presentó un IC_{50} de 24,1 μ M y el segundo un IC_{50} de 249,5 μ M, siendo este último diez veces menos activo que el primero. Para comprobar si tenía importancia en la actividad IECA la sustitución del aminoácido Val por el aminoácido dicarboxílico en la cuarta posición del extremo C-terminal, llevaron a cabo la síntesis del péptido ERYL que resultó tener un IC_{50} de 200,3 μ M, es decir, una actividad IECA ocho veces inferior al VRYL. Esto pone de manifiesto el papel

fundamental de la Val en la cuarta posición del extremo C-terminal para la actividad del péptido VRYL (Gómez-Ruiz y col., 2004a).

Los péptidos pueden adquirir distintas conformaciones, por lo que no sólo la secuencia aminoacídica sino su estructura final van a determinar su capacidad IECA. Las secuencias que contienen *trans*-Pro en su extremo C-terminal son mejores sustratos de la enzima que las que contienen *cis*-Pro. El cambio que se produce en la estructura del inhibidor dependiendo de que posea el isómero *cis* o *trans* de la prolina va a influir en su interacción con el sitio activo de la enzima. Gómez-Ruiz y col., 2004b, estudiaron la actividad IECA y caracterizaron estructuralmente mediante espectrometría de masas en tándem (**MS/MS**) y resonancia magnética nuclear, el pentapéptido DKIHP obtenido por dos procedimientos distintos de síntesis química (Boc y Fmoc). Los análisis mostraron que cuando el péptido era sintetizado por el método Fmoc la preparación contenía sólo la forma *trans*-Pro y mostraba una significativa actividad IECA, con un valor de IC_{50} de 113,18 μ M. Sin embargo, el péptido sintético obtenido por Bmoc presento una actividad mucho menor que en el caso anterior (IC_{50} 577,92 μ M) y los análisis estructurales mostraron que la preparación del péptido contenía tres conformaciones distintas, dos con *trans*-Pro y una con *cis*-Pro (Gómez-Ruiz y col., 2004b).

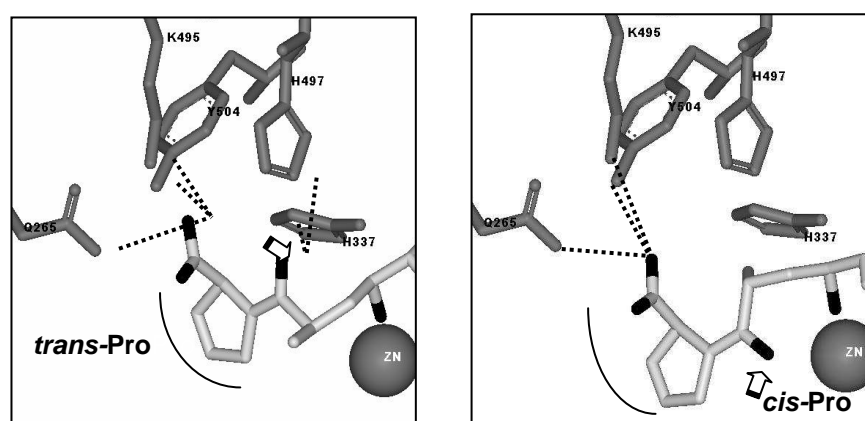


Figura 4. Modelo de interacción entre el péptido inhibidor con las conformaciones *trans*-Pro y *cis*-Pro en el extremo C-terminal (gris claro), y el sitio activo de la ECA (gris oscuro). Los puentes de hidrógeno están marcados en líneas discontinuas de color negro y los grupos carbonilo y carboxilo (CO y COO⁻) están coloreados en negro. El cambio de *trans*-Pro a *cis*-Pro produce un desplazamiento del grupo CO del aminoácido anterior del péptido inhibidor DKIHP (señalado con una flecha) al sitio opuesto de la cadena peptídica, perdiendo la unión de un puente de hidrógeno con la enzima.

Los isómeros L y D de los aminoácidos en algunas posiciones de la secuencia peptídica también influyen en la estereoespecificidad de ECA. Así, la enzima muestra una gran afinidad por la estereoespecificidad del aminoácido que se encuentra en tercera posición empezando por el extremo C-terminal, pero muy baja estereoespecificidad por el residuo que se encuentra en cuarta posición desde el extremo C-terminal (Oshima y col., 1979). Por ejemplo, Maruyama y col., 1987, encontraron que el tripéptido D-VAP mostraba una baja actividad IECA (IC_{50} 550 μ M) mientras que la configuración L del mismo péptido mostraba una potente actividad (IC_{50} 2 μ M), en cambio, la actividad IECA de las configuraciones del tetrapéptido L-FVAP y D-FVAP era prácticamente la misma, presentando un IC_{50} de 10 y 17 μ M respectivamente.

3.3. Estrategias para la producción de péptidos antihipertensivos

Básicamente, la producción de péptidos con actividad IECA y/o antihipertensiva a partir de su proteína de origen se puede realizar, mediante hidrólisis con diferentes tipos de enzimas: digestivas, microbianas o vegetales, mediante fermentación con diferentes tipos de microorganismos o mediante una combinación de estos procesos (Korhonen y Pihlanto, 2006). Además de estos procedimientos, también se han obtenido secuencias activas por síntesis química (Kohmura y col., 1989), y se han utilizado técnicas de ADN recombinante para obtener péptidos activos o precursores de éstos. Kim y col., 1999, expresaron por ingeniería genética y purificaron la α_{s1} -caseína humana en *Escherichia coli*, para obtener posteriormente su hidrolizado tríptico rico en péptidos inhibidores de la ECA. También, se ha expresado en *Escherichia coli* el péptido inhibidor de la ECA derivado de la β -caseína FFVAPFPEVFGK, identificado por Maruyama y Suzuki, 1982 en un hidrolizado tríptico de caseínas (Lv y col., 2003).

3.3.1. Fermentación

Leches fermentadas

La fermentación láctea se ha empleado con éxito para la producción de péptidos con actividad IECA y antihipertensiva. Existen estudios que muestran una relación proporcional entre la inhibición de la ECA *in vitro* y el nivel de proteólisis en distintas leches fermentadas (Fuglsang y col., 2003). Sin embargo, cabe destacar que con la mayoría de los cultivos iniciadores empleados en la fabricación de productos lácteos fermentados no se generan péptidos inhibidores de la ECA (Pihlanto-Leppälä y col., 1998). El cultivo iniciador empleado, y en concreto, la especificidad de sus enzimas y su capacidad proteolítica, son determinantes para llevar a cabo la producción de péptidos con actividad antihipertensiva. Así, se ha encontrado que ciertas cepas de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* o *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* son capaces de producir leches fermentadas que presentan actividad/péptidos IECA (Yamamoto y col., 1999; Leclerc y col., 2002; Hernández-Ledesma y col., 2004c). En la **Tabla 1** se muestran las secuencias con actividad IECA identificadas en leches fermentadas con distintos tipos de microorganismos, el valor de su IC₅₀ y en los casos donde se ha determinado, su capacidad antihipertensiva en SHR. Como se puede ver en esta tabla la mayoría de los péptidos IECA identificados hasta el momento en leches fermentadas son producidos por distintas cepas de *Lactobacillus helveticus*.

Lb. helveticus es una bacteria que posee una alta capacidad proteolítica en la leche, y algunas de sus cepas (CPN4, CP790, CP611, CP615, JCM1006, JCM 1004, LBK 16H, R211, R389, NCC2765) son capaces de producir leches fermentadas con actividad/péptidos IECA (Yamamoto y col., 1994; Yamamoto y col., 1999; Sipola y col., 2002b; Leclerc y col., 2002; Robert y col., 2004; Pan y col., 2005). De hecho, algunos de los péptidos con actividad IECA y antihipertensiva más potentes identificados hasta el momento en proteínas alimentarias, fueron aislados por el grupo del Dr. Yamamoto en una leche fermentada con *Lb. helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta

leche se encuentra comercializada en Japón por la compañía Calpis® con el nombre de Ameal S, y las secuencias de aminoácidos identificadas como responsables de su actividad antihipertensiva son los tripéptidos VPP e IPP. Estos péptidos presentaron valores de actividad IECA expresados como IC₅₀ de 5 y 9 µM respectivamente (Nakamura y col., 1995a). Estas mismas secuencias se encuentran también en la leche Evolus® fermentada con la cepa LBK-16H de *Lb. helveticus*, comercializada por Valio Ltd en Finlandia como alimento con fines terapéuticos para el tratamiento de la hipertensión. Recientemente, una cepa de *Lb. helveticus* que produce una leche con propiedades antihipertensivas ha sido patentada (Flambart 2004; 2005), lo que ha permitido el desarrollo del producto Cardi-04™ por Chr. Hansen A/S en Dinamarca, que se comercializa como bacteria ácido láctica con la habilidad para generar péptidos antihipertensivos durante la fermentación.

Tabla 1. Péptidos inhibidores de la ECA identificados en leches fermentadas.

Fragmento	Secuencia	IC50 (\square M)	Bacterias lácticas	Disminución PAS mmHg	Referencia
β -CN f(84-86)	VPP	9	<i>Lb. helveticus</i> y <i>Sacc. cerevisiae</i>	32.1 +/- 5.3	Nakamura y col. (1995)
β -CN f(74-76)	IPP	5	<i>Lb. helveticus</i> y <i>Sacc. cerevisiae</i>	28.3 +/- 4.8	Nakamura y col. (1995)
α_{s1} -CN f(146-147) β -CN f(114-115) κ -CN (58-59)	YP	720	<i>Lb. helveticus</i> CPN4	27.1 +/- 7.1	Yamamoto y col. (1999)
β -CN f(6-14)	LNVPGEIVE	300.1	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> SS1	n.d	Gobbetti y col. (2000)
β -CN f(73-82)	NIPPLTQTPV	173.3	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> SS1	n.d	Gobbetti y col. (2000)
β -CN f(147-155)	NLHLPLPLL	15	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
β -CN f(146-155)	ENLHLPLPLL	250	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
β -CN f(145-155)	VENLHLPLPLL	175	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
α_{s1} -CN f(39-48)	FVAPFPEVFG	650	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
α_{s1} -CN f(33-48)	ENLLRFFVAPF PEVFG	250	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
α_{s1} -CN f(32-48)	NENLLRFFVAP FPEVFG	55	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)
α_{s1} -CN f(31-48)	LNENLLRFFVA PFPEVFG	280	<i>Lb. helveticus</i> NCC 2765	n.d	Robert y col. (2004)

La especificidad de las enzimas de algunas cepas de *Lb. helveticus* para producir péptidos con actividad IECA se ha demostrado en varios estudios. La **Tabla 2** muestra varias secuencias de péptidos con actividad IECA y/o antihipertensiva obtenidos por hidrólisis de las caseínas con enzimas aisladas o purificadas de *Lb. helveticus*, el valor de su IC₅₀ y en los casos donde se ha determinado su capacidad antihipertensiva en SHR. Yamamoto y col., 1993, llevaron a cabo el aislamiento y purificación de una proteinasa asociada a la pared celular de *Lb. helveticus* CP790, que se empleó para llevar a cabo la digestión de las caseínas lácteas (Yamamoto y col., 1994; Maeno y col., 1996). En este hidrolizado se identificaron un total de 25 péptidos procedentes de la α_{s1} -CN y de la β -CN, algunos de ellos mostraron una potente actividad IECA (**Tabla 2**). Además, este hidrolizado disminuyó de la presión arterial cuando se suministró a SHR. Este efecto antihipertensivo se observó también cuando se suministró la leche fermentada directamente con *Lb. helveticus* CP790. Sin embargo, los dos controles utilizados en este estudio; un hidrolizado triptico de caseínas y la leche fermentada con *Lb. helveticus* CP791, una variante de la cepa CP790 que carece de la proteinasa, no causaron disminución de la presión arterial, lo que pone de manifiesto que los péptidos liberados por la proteinasa de la pared de *Lb. helveticus* CP790 es la responsable de la capacidad de este microorganismo para producir una leche fermentada con efecto hipotensor (Yamamoto y col., 1994). También se han obtenido péptidos con actividad IECA y antimicrobiana a partir de las caseínas lácteas procedentes de seis especies distintas; vaca, oveja, cabra, búfalo, cerdo y humano, utilizado una proteinasa de *Lb. helveticus* PR4 purificada parcialmente (Minervini y col., 2003).

Además de *Lb. helveticus* otras bacterias ácido lácticas se han mostrado como productoras de leches fermentadas con actividad/péptidos IECA. Por ejemplo, se han aislado y caracterizado péptidos inhibidores de la ECA en leches fermentadas con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4, que son LAB con un uso muy extendido como cultivos iniciadores en la fabricación de leches fermentadas y varios tipos de quesos (Gobbetti y col., 2000). Varios productos lácteos fermentados del mercado español, presentaron una moderada actividad IECA (Hernández-Ledesma y col., 2004b; 2005), aunque superior a la obtenida en leche

pasteurizada y UHT. En la India se comercializa la “leche Dahi”, fermentada con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a la cual se han atribuido efectos beneficiosos para la salud, y que posee actividad IECA *in vitro* y antihipertensiva en humanos (Ashar y Chand, 2003; 2004a). Los resultados de estos estudios revelan de la importancia de la fermentación como procedimiento en la generación de péptidos inhibidores de la ECA a partir de las proteínas lácteas o de oligopéptidos precursores de péptidos con actividad (Hernández-Ledesma y col., 2004c).

Tabla 2. Péptidos inhibidores de la ECA obtenidos por hidrólisis de las caseínas bovinas con proteinasas de *Lactobacillus helveticus*

Fragmento	Secuencia	Cepa de <i>L. helveticus</i>	IC50 (μM)	Disminución PAS mmHg	Referencia
α _{s1} -CN f(104-109)	YKVPQL	CP790	22	12,5 +/- 5,2	Maeno y col. (1996)
α _{s1} -CN f(143-148)	AYFYPE	CP790	106	n.d	Yamamoto y col. (1994)
α _{s1} -CN f(170-199)	GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	CP790	346	n.d	Yamamoto y col. (1994)
α _{s1} -CN f(1-6) ^a	RPKHPI	PR4	40.3	n.d	Minervini y col. (2003)
α _{s2} -CN f(198-202)	TKVIP	CP790	400	9,2 +/- 2,7	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(189-192)	AMKPW	CP790	580	4,6 +/- 5,8	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(190-197)	MKPWIQPK	CP790	300	2,9 +/- 5,9	Maeno y col. (1996)
α _{s2} -CN f(189-197)	AMKPWIQPK	CP790	600	0,6 +/- 4,2	Maeno y col. (1996)
β-CN f(169-175)	KVLPVPQ	CP790	>1000	24,1 +/- 7,8	Maeno y col. (1996)
β-CN f(43-69)	DELQDKIHPFAQTQSLVYPPGPIINS	CP790	4	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(70-97)	LPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	CP790	144	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(113-127)	KYPVQPFTESQSLTL	CP790	93	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(158-175)	PPQSVLSLSQSKVLPVPE	CP790	25	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(161-175)	SKVLPVPE	CP790	39	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(183-190)	RDMPIQAF	CP790	209	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(191-209)	LLYQQPVLGPVVRGPFPIIV	CP790	21	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(193-209)	YQQPVLGPVVRGPFPIIV	CP790	101	n.d	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(140-143)	LQSW	CP790	500	1,6 +/- 3,4	Maeno y col. (1996)
β-CN f(58-66)	LVYPPGPI	PR4	183.5	n.d	Minervini y col. (2003)

Quesos

Durante el proceso de maduración del queso se produce una hidrólisis de las proteínas lácteas como consecuencia de la acción concertada de varias enzimas de distinta procedencia como son: las enzimas endógenas de la leche, fundamentalmente

la plamina, el cuajo utilizado para la fabricación del queso y las enzimas del cultivo microbiano iniciador y de otro tipo de microorganismos que intervienen en esta etapa (López-Fandiño y col., 2006). En la maduración, se van a formar por tanto una serie de péptidos, cuyo número y características van a depender de las materias primas empleadas en la elaboración del queso (leche, cuajo y microorganismos) y de las características del proceso de fabricación. En este sentido, diferentes tipos de quesos se han mostrado como fuente de péptidos con actividad IECA y cuya actividad antihipertensiva ha sido demostrada en algunos casos (Saito y col., 2000).

En la **Tabla 3** se muestran algunas de las secuencias de péptidos inhibidores de la ECA identificados en distintos tipos de quesos, su valor de IC_{50} y el valor de disminución de la presión arterial en SHR. Algunos de estos estudios han mostrado que la actividad IECA en los quesos va aumentando al incrementarse el nivel de proteólisis durante la maduración, hasta un determinado límite en el cual comienzan a degradarse los fragmentos activos que se habían formado dando lugar a secuencias inactivas, produciéndose una disminución de la actividad (Meisel, 1997). Este es el caso de un queso Manchego donde se estudió la actividad IECA y se identificaron secuencias activas en el extracto soluble en agua. Los valores de actividad IECA fueron bajos durante los cuatro primeros meses, aumentaron hasta el octavo mes en el cual la actividad fue máxima, y después la actividad volvió a disminuir hasta el décimo segundo mes (Gómez-Ruiz y col., 2002).

También se han aislado y caracterizado secuencias activas en distintas clases de quesos españoles (Gómez-Ruiz y col., 2006), de quesos italianos (Addeo y col., 1992), en queso Gouda (Saito y col., 2000), en queso Parmesano (Meisel y col., 1997), y en un queso con bajo contenido en grasa comercializado en Finlandia con el nombre de "Festivo" (Ryhänen y col., 2001). En este último se aislaron tres péptidos procedentes de la α_{s1} -caseína, f (1-9), f (1-7) y f (1-6), que presentaron actividad IECA. El péptido α_{s1} -caseína (1-9) se forma también durante la maduración del queso Gouda y presenta una alta actividad IECA (IC_{50} 13,4 μ M) y una moderada actividad antihipertensiva (9.3 +/- 4.8 mmHg).

Tabla 3. Péptidos inhibidores de la ECA identificados en distintos tipos de diferentes quesos

Queso	Secuencia	Péptido	IC50 (μM)	Disminución máxima de la PAS mmHg en SHR	Referencia
Manchego	β -CN f(199-204)	VRGPFPP	592,0	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2002)
	α_{s2} -CN f(205-208)	VRYL	24,1	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2004a)
	α_{s1} -CN f(86-92)	VPSERYL	249,5	n.d	Gómez-Ruiz y col. (2004a)
	α_{s1} -CN f(102-109)	KKYNVPL	77,1	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2004a)
	α_{s2} -CN f(202-204)	IPY	206,0	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2004a)
Gouda 8 meses	α_{s1} -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13,4	9,3 +/- 4,8	Saito y col., (2000)
	β -CN f(60-68)	YPPFGPIP	14,8	7,0 +/- 3,8	Saito y col., (2000)
Crescenza	β -CN f(58-72)	LVYPPFGPIPNSLPQ	18,0	n.d	Smachi and Gobbeti, (1998)
Queso de cabra	β -CN f(201-204)	VRGP	120,9	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2006)
Manchego	Varios fragmentos	PFP	144,4	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2006)
Manchego, Roncal, Idiazabal, Cabrales, Queso de Cabra	β -CN f(47-51)	DKIHP	113,1	n.d	Gómez-Ruiz y col., (2006)

3.3.2. Hidrólisis con enzimas

La utilización de enzimas de distintos orígenes para hidrolizar proteínas es una de las técnicas más empleadas en la producción y caracterización de péptidos bioactivos. La liberación de los péptidos con actividad depende del sustrato, de la enzima utilizada para llevar a cabo la proteólisis, y de las condiciones del proceso de hidrólisis tales como la temperatura, el pH, el tiempo, etc.

En la **Tabla 4** se muestran algunos de los péptidos inhibidores de la ECA identificados en hidrolizados de proteínas lácteas con distintas enzimas, el valor del IC₅₀ y, en los casos donde se ha determinado, su capacidad antihipertensiva en SHR. Como se puede observar en la **Tabla 4**, la tripsina es una de las enzimas que se ha empleado con éxito en la producción de péptidos con actividad. Esto puede deberse a la especificidad que presenta la ECA por sustratos o inhibidores competitivos con Lys o Arg en el extremo C-terminal (López-Fandiño y col., 2006). Un ejemplo de esto lo encontramos en los trabajos llevados a cabo por Maruyama y colaboradores, en un hidrolizado tríptico de caseína bovina donde identificaron varias secuencias con potente actividad IECA y antihipertensiva (Maruyama y Suzuki, 1982, Maruyama y col., 1985; 1987). Más recientemente, hidrolizados trípticos de proteínas de suero (Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Mullally y col., 1997), de α_{s2} -caseína (Tauzin, Miclo y Gaillard, 2002) y de κ -caseína (Manso y López-Fandiño, 2003) se han mostrado también como fuente de péptidos inhibidores de la ECA.

Otras enzimas de origen animal, vegetal y microbiano, como por ejemplo: la alcalasa, quimotripsina, elastasa, termolisina, proteinasa K, pepsina, preparados de enzimas pancreáticas, etc. también se han empleado para la obtención de péptidos con actividad IECA a partir de las proteínas de suero y de las caseínas. Algunas de ellas, como por ejemplo la elastasa, una enzima de origen vegetal, mostró una baja eficacia a la hora de producir hidrolizados de proteínas de suero con actividad IECA (Mullally, Meisel y FitzGerald., 1997; Pihlanto-Leppälä y col., 2000); probablemente debido a la

estructura rígida que presentan estas proteínas que las hace menos susceptibles a la hidrólisis. Sin embargo, enzimas de origen microbiano como son la termolisina y la proteinasa K han mostrado una alta especificidad para generar péptidos activos a partir de las seroproteínas. Por ejemplo, Hernández-Ledesma y col., 2002, llevaron a cabo la hidrólisis de β -lactoglobulina ovina y caprina con varias enzimas de distintos orígenes, siendo los hidrolizados preparados con enzimas de origen microbiano los que presentaron mayor actividad. En uno de estos hidrolizados preparado con la proteasa termolisina, se identificaron las secuencias LLF y LQKW, que poseían una potente actividad IECA (Hernández-Ledesma y col., 2002; 2006).

Recientemente, con una proteasa derivada del moho *Aspergillus Oryzae* se ha producido un hidrolizado de caseínas con una potente actividad IECA y antihipertensiva en SHR, comparado con otros hidrolizados de caseína preparados con proteasas comerciales de distinta procedencia (Mizuno y col., 2004). Se ha demostrado la presencia de los potentes inhibidores de la ECA IPP y VPP en este hidrolizado (Matsuura y col., 2005), así como su eficacia para disminuir la presión arterial en pacientes con hipertensión moderada y alta (Sano y col., 2005; Mizuno y col., 2005a).

Tabla 4. Péptidos inhibidores de la ECA obtenidos a partir de proteínas lácteas por hidrólisis enzimática

Fragmento	Secuencia	IC50 (μ M)	Enzima	Disminución PAS mmHg	Referencia
α_{s1} -CN f(23-34)	FFVAPFPEVFGK	77	tripsina	34 +/- 13	Maruyama y Suzuki., (1982) Karaki y col., (1990)
β -CN f(177-183)	AVPYPQR	15	Tripsina	10 +/- 0,7	Maruyama y col., (1985) Karaki y col., (1990)
α_{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	16	Tripsina	13,6 +/- 3,6	Maruyama y col., (1987a) Karaki y col., (1990)
α_{s1} -CN f(23-27)	FFVAP	6	Tripsina + endopeptidasa específica de prolina	n.d	Maruyama y col., (1987)
β -Ig f(142-148)	ALPMHIR	42,6	Tripsina	n.d	Mullally y col., (1997)
β -CN f(193-202)	YQQPVLGPVR	300	Tripsina	n.d	Meisel y Schlimme, (1994)
β -Ig f(102-105)	YLLF	172	Tripsina	n.d	Chiba y Yoshikawa, (1986)
α -La f(99-108)	VGINYWLAHK	327	Tripsina	n.d	Philanto-Leppälä y col., (2000)
α -La f(104-108)	WLAHK	77	Tripsina	n.d	Philanto-Leppälä y col., (2000)
β -Ig f(103-105)	LLF	79,8	Termolisina	n.d	Hernández-Ledesma y col., (2002)
β -Ig f(58-61)	LQKW	34,7	Termolisina	n.d	Hernández-Ledesma y col., (2002)

3.4. Biodisponibilidad

El potencial efecto hipotensivo de los péptidos inhibidores de la ECA depende de su capacidad para alcanzar intactos los órganos donde van a realizar su función. Varios estudios llevados a cabo con animales hipertensos y ensayos clínicos en humanos han demostrado que ciertas secuencias tienen la capacidad de disminuir la presión arterial, sin embargo es difícil establecer una relación directa entre la capacidad de inhibir la ECA *in vitro* y la actividad antihipertensiva *in vivo*. El estudio del mecanismo de acción de los péptidos bioactivos es fundamental a la hora de diseñar alimentos funcionales con propiedades fisiológicas (Shimizu, 2004 biofactors). Se sabe que dipéptidos y tripéptidos pueden transportarse a través de la mucosa intestinal vía el transportador PepT₁ (Yang y col., 1999). Sin embargo, existen también evidencias de que péptidos de mayor tamaño pueden absorberse en el intestino delgado (Chabance y col., 1998; Gardner, 1984; Roberts y col., 1999). Se ha demostrado que algunos péptidos con actividad IECA y antihipertensiva son capaces de absorberse en el tracto gastrointestinal acumulándose en diversos órganos por lo que podrían ejercer su mecanismo de acción sistémicamente (Masuda y col., 1996; Matsui y col., 2002b). Sin embargo, se postula que determinados péptidos antihipertensivos podrían no absorberse en el tracto intestinal, ejerciendo una función directa en el lumen intestinal o bien podrían ejercer su función mediante la interacción con receptores que se encuentran en la pared del intestino.

Las enzimas digestivas, la absorción a través del tracto intestinal y las proteasas sanguíneas, pueden producir la hidrólisis de los péptidos inhibidores de la ECA dando lugar a fragmentos inactivos o con una actividad mayor que su secuencia precursora (Vermeirssen et al., 2004). Además, para ejercer un efecto *in vivo* los péptidos inhibidores de la ECA no deben ser sustratos de la enzima. En este sentido, los péptidos pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a su comportamiento frente a la ECA: (1) los verdaderos inhibidores, cuyo IC₅₀ no se ve modificado tras la incubación con la enzima, (2) péptidos que son sustrato de la ECA y que por tanto son hidrolizados tras la incubación dando lugar a fragmentos que presentan baja actividad IECA, y (3) péptidos que son convertidos en verdaderos inhibidores bien por la acción de la ECA o

por las proteasas gastrointestinales. Sólo las secuencias que pertenecen a los grupos 1 y 3, pueden ser potenciales para mostrar un efecto antihipertensivo (Fujita y col., 2000).

Digestión gastrointestinal

La simulación de la digestión fisiológica es una herramienta muy útil para evaluar la estabilidad de los péptidos con actividad IECA frente a las enzimas digestivas. Además, como se vio anteriormente, la digestión con proteasas gastrointestinales es una buena estrategia para la obtención de péptidos con actividad (ver apartado 3.3.2); con la ventaja de que los péptidos formados durante la hidrólisis serán resistentes a la digestión fisiológica después de ser ingeridos (Matsui y col., 2002a).

Se han llevado a cabo varios estudios *in vitro* que muestran la importancia de la digestión en la formación y degradación de péptidos inhibidores de la ECA (Gómez-Ruiz y col., 2004a; Hernández-Ledesma y col., 2004; Vermeirssen y col., 2003; Roufik y col., 2006). En estos estudios los péptidos se someten a dos etapas de hidrólisis donde se simula el proceso de digestión que tiene lugar en el organismo. En primer lugar, se lleva a cabo una hidrólisis con pepsina a pH ácido que simula el proceso de digestión que tiene lugar en el estómago, y a continuación, en una segunda etapa, se realiza una digestión con un extracto pancreático a pH básico para simular el proceso de digestión intestinal.

La simulación de la digestión también es útil a la hora de estudiar la forma activa y el mecanismo de acción de péptidos con demostrada actividad antihipertensiva *in vivo*. Por ejemplo, Miguel y col., 2006, encontraron que el péptido YAEERYPIL, derivado de la ovoalbúmina, que presentaba una potente actividad IECA ($IC_{50} = 5,4 \mu M$) y antihipertensiva, era susceptible a la degradación por las enzimas digestivas. El péptido sufría una hidrólisis total tras la simulación gastrointestinal dando lugar a los fragmentos YAEER y YPI. Ensayos con ratas SHR mostraron que el péptido YAEER no bajaba significativamente la presión arterial, siendo el tripéptido YPI el que presentaba un efecto antihipertensivo significativo. Este fragmento que sería la posible forma activa de la secuencia YAEERYPIL, podría ejercer su acción por un mecanismo distinto a la inhibición de la ECA (Miguel y col., 2006).

Absorción en el intestino

Los péptidos que han resistido el proceso de digestión y llegan intactos al intestino, bien pueden ejercer una función local, o si su acción es sistémica deben atravesar el epitelio y pasar al torrente circulatorio. Existen tres rutas fundamentales a través de las cuales los péptidos pueden ser transportados en el epitelio intestinal: mediante un transportador específico, por vía paracelular, o por trancitosis (**Figura 4**). El tamaño de los péptidos y su hidrofobicidad son factores fundamentales que van a influir en el tipo de transporte (Shimizu y col., 1997). Se ha descrito que dipéptidos y tripéptidos pueden transportarse activamente mediante el transportador PepT₁ (Meredith y Boyd, 1995). Otros péptidos y proteínas pasan a través del epitelio intestinal pasivamente por vía paracelular, como es el caso del tetrapéptido GGYR (Shimizu y col., 1997). Por último, la trancitosis; un mecanismo de transporte que tiene lugar en el interior de las células mediado por vacuolas, se ha descrito como ruta principal para el transporte de determinados péptidos como por ejemplo la bradiquinina (Shimizu y col., 1997).

Los mecanismos de transporte de oligopéptidos a través del intestino se han investigado mediante el empleo de células Caco-2; una línea de células procedente de un carcinoma colorectal humano que presentan actividades enzimáticas y mecanismos de transporte similares a los del epitelio del intestino delgado. Por esta razón las células Caco-2 se han establecido como modelo para estudiar la absorción de fármacos y de otros compuestos en el intestino.

Existen muy pocos estudios sobre el transporte de péptidos inhibidores de la ECA en el intestino. Satake y col., 2002, demostraron que el tripéptido antihipertensivo VPP se transportaba principalmente por difusión a través de células Caco-2, aunque una pequeña cantidad del péptido podría absorberse transcelularmente vía el transportador PepT₁. Otro péptido inhibidor de la ECA, el heptapéptido lactokinina, ALPMHIR, procedente de un hidrolizado de la β -lactoglobulina con tripsina, se absorbía intacto y rápidamente, cuando se incubaba con una capa de células Caco-2. No se descartó, que el ALPMHIR fuera hidrolizado por las peptidasas durante el proceso de transporte, ya que se detectó una baja concentración del péptido en la parte basolateral, donde se

recogen los compuestos que han atravesado las células Caco-2 (Vermeirssen y col., 2002b).

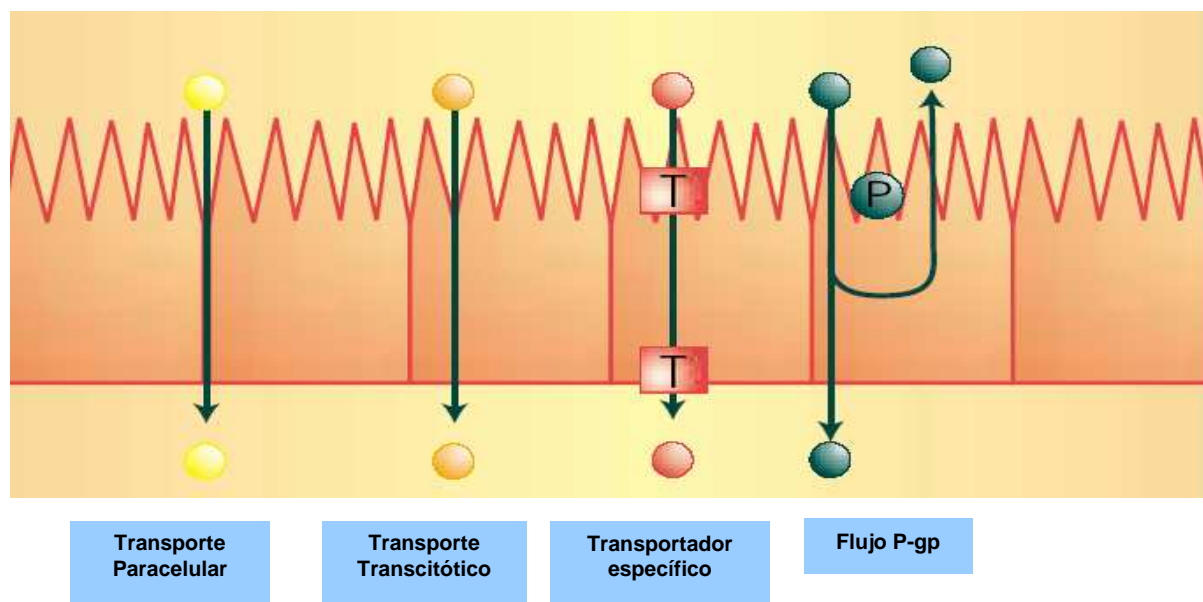


Figura 5. Rutas de transporte de un compuesto a través del epitelio intestinal

Estabilidad en el suero sanguíneo

El elevado número de péptidasas que se encuentran en la sangre hace que el tiempo en el que ciertos péptidos son estables en el plasma sea muy corto. Sin embargo, existen evidencias de que péptidos con actividad IECA pueden absorberse en el tracto digestivo y ser transportados por el torrente circulatorio sin ser hidrolizados por las proteasas sanguíneas. El tripéptido antihipertensivo VPP fue detectado en la aorta de SHR a las que se había suministrado la leche fermentada Calpis® (Masuda y col., 1996). Otro péptido con actividad IECA y antihipertensiva con secuencia VY derivado de músculo de sardina fue detectado en plasma humano, siendo su absorción transepitelial dosis-dependiente y alcanzando el máximo de concentración en plasma después de 2 horas de la administración oral del péptido a sujetos normotensos. Sin embargo, las cantidades detectadas de VY en el plasma fueron muy bajas comparadas con las dosis suministradas, probablemente debido a una rápida acumulación del péptido en los tejidos (Matsui y col., 2002). De hecho, se demostró que el péptido VY se encontraba en cantidades mucho mayores en los tejidos de diversos órganos que en

el plasma, y que este dipéptido producía la supresión de los sistemas renina-angiotensina aórtico y renal, lo que pone de manifiesto que probablemente la aorta y el riñón sean los órganos diana del VY (Matsui y col., 2004).

3.5. Productos lácteos con efecto antihipertensivo

Los modelos *in vitro* proporcionan una información muy valiosa para evaluar la susceptibilidad de los péptidos con actividad IECA a las diferentes peptidasas y proteasas del organismo y determinar su paso a través de la barrera intestinal. Sin embargo, estos estudios tienen una serie de limitaciones; por ejemplo, se ha comprobado que los experimentos de digestión *in vitro* no pueden predecir con total seguridad el comportamiento de los péptidos durante la digestión gastrointestinal. El grado de hidrólisis de un determinado péptido durante la digestión fisiológica va a depender de su tamaño, de su naturaleza, y de la presencia de otros péptidos en el medio (Roufik y col., 2006). Sólo mediante los estudios en animales y en humanos se puede asegurar el efecto hipotensivo de un determinado péptido o de un alimento funcional (FitzGerald y col., 2004).

Estudios en ratas

La actividad antihipertensiva de varios péptidos y productos lácteos con actividad IECA se ha investigado mediante ensayos con SHR. Estos estudios constituyen un paso previo a los ensayos clínicos con humanos. La capacidad antihipertensiva de la leche fermentada Calpis® y de los potentes inhibidores de la ECA IPP y VPP identificados en esta leche, se demostró en SHR. Tras la administración aguda de los péptidos se comprobó que la disminución de la presión arterial estaba directamente relacionada con la cantidad suministrada de éstos, concluyendo así su papel fundamental en el efecto hipotensor de la leche fermentada (Nakamura y col., 1995b). Además en ratas SHR alimentadas durante un largo periodo con leche Calpis® se vió que la presión arterial sistólica y la actividad de la ECA en la aorta era significativamente más bajas que las ratas alimentadas con una leche control

(Nakamura y col., 1996). La disminución de la presión arterial tras la administración de la leche fermentada Evolus[®] y de los péptidos IPP y VPP en un tratamiento crónico se ha observado en otros estudios (Sipola y col., 2001; 2002b), corroborando así la eficacia de los productos fermentados que contienen los tripéptidos IPP y VPP para atenuar el desarrollo de hipertensión a largo plazo.

También se ha medido la presión sanguínea a corto y largo plazo tras la administración aguda y crónica a SHR de un hidrolizado trípico de caseínas que presentaba actividad IECA ($IC_{50}=166 \mu\text{g/ml}$), y que contenía los péptidos inhibidores de la ECA, FFVAPFPEVFGK, TT MPLW y AVPY PQR derivados de la β -CN (Maruyama y col., 1987a;1985; Murayama y Suzuki, 1982). El hidrolizado disminuyó la presión arterial de las SHR y provocó una inhibición de la vasoconstricción causada por la conversión de angiotensina I a angiotensina II. Estos resultados sugieren que realmente el efecto antihipertensivo del hidrolizado es debido a los péptidos con actividad IECA que contiene (Karaki y col., 1990)

Estudios en humanos

Existen muy pocos trabajos en los que se evalúe las propiedades antihipertensivas de alimentos o péptidos con actividad IECA en humanos (**Tabla 5**; López-Fandiño y col., 2006). En algunos de estos estudios como los realizados con el fragmento 23-34 de la α_{s1} -caseína y el hidrolizado BioZate[®], no se proporcionan datos sobre la concentración de los componentes activos y el diseño de los experimentos se describe brevemente (Pins y Keenan, 2003; Sugai, 1998; Townsend y col., 2004). La mayor parte de los estudios en humanos se centran en leches fermentadas e hidrolizados que contienen las secuencias IPP y VPP. En los últimos 10 años se han llevado a cabo más de 20 ensayos clínicos en poblaciones de origen japonés y europeos, demostrándose la eficacia de estos tripéptidos para disminuir la presión arterial. Los ensayos se han realizado en sujetos con hipertensión moderada o tensión normal alta y en sujetos hipertensos. Las diferencias que se observan en el efecto de la disminución de la presión arterial de los péptidos pueden deberse a diferencias en las poblaciones, si son

de origen europeo o japonés, la dieta de origen o el diseño de los experimentos. Cabe destacar que las reducciones en la presión arterial sistólica que causan el IPP y el VPP en humanos, son muy modestas en comparación con los efectos previamente documentados en SHR (-28,3 y -32,1 mmHg, respectivamente; Nakamura y col., 1995b).

En los ensayos clínicos realizados hasta el momento con los tripéptidos IPP y VPP, no se han observado efectos secundarios tales como son tos y problemas en el metabolismo de lípidos, que sí se presentan con otros fármacos inhibidores de la ECA como el captopril (Takano, 1998). Además, estos ensayos muestran la capacidad de los péptidos inhibidores de la ECA para disminuir de forma gradual la tensión arterial en sujetos hipertensos, pero no se detectan disminuciones en la presión arterial de aquellos que están dentro de la normalidad. Por otro lado, distintos estudios toxicológicos realizados con animales para comprobar la seguridad de los péptidos IPP y VPP muestran que la administración de estos péptidos, incluso a dosis muy altas, no presenta efectos adversos (Maeno y col., 2005; Mizuno y col., 2005b).

En la **Tabla 5** se encuentran reflejados los productos que existen en el mercado y que ofrecen alegaciones acerca de la reducción de la presión arterial en humanos, los componentes activos responsables de la reducción de la presión arterial y las dosis utilizadas y la presión arterial inicial de los sujetos en los estudios. Entre otros productos, se encuentra la leche fermentada Calpis que contiene los péptidos IPP y VPP comercializada en Japón por Calpis Co., que además comercializa un hidrolizado de caseínas con *Aspergillus oryzae* con el nombre de AmealPeptide[®] cuyos componentes activos también son el IPP y el VPP. Unilever ha añadido AmealPeptide[®] a un yogur líquido lanzando al mercado español un producto designado como Flora/Becel pro.active[®]. De la misma forma, el producto lácteo Evolus[®] fermentado con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H (Valio Ltd, Finlandia y Kaiku Vitabrand[®], España), un hidrolizado de caseínas que contiene el péptido FFVAPFEVFGK (α_{s1} -caseína 23-34) (Casein DP, Kanebo, Ltd, Japón, y C12 peptide, DMV, Países Bajos) y un hidrolizado de proteínas de suero (BioZate, Davisco, US), se comercializan como productos con propiedades antihipertensivas.

Tabla 5. Estudios clínicos con productos lácteos y péptidos que presentan efecto antihipertensivo en humanos

Producto	Componente activo Dosis	Tensión arterial inicial de los sujetos	Efecto en la presión arterial sistólica	Referencia
Calpis (leche fermentada)	IPP (1,04 mg) VPP (1,42 mg)	Hipertensos	-9,4 mmHg (4 semanas) -14,1 mmHg (8 semanas)	Hata y col., (1996)
Calpis (leche fermentada)	IPP (1,15 mg) VPP (1,98 mg)	Hipertensión media	-4,3 mmHg (2 semanas) -5,2 mmHg (4 semanas)	Mizushima y col., (2004)
Péptido Ameal (Hidrolizado de caseínas)	IPP + VPP (1,8 mg) IPP + VPP (2,5 mg) IPP + VPP (3,6 mg)	Presión arterial normal alta Hipertensión moderada	-6,3 mmHg (6 semanas) -6,7 mmHg (6 semanas) -10,1 mmHg (6 semanas)	Mizuno y col., (2005a)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	IPP (2,25 mg) VPP (3-3,75 mg)	Hipertensión moderada	-14,9 mmHg (8 semanas)	Seppo y col., (2002)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	IPP (2,25 mg) VPP (3-3,75 mg)	Hipertensos	-6,7 mmHg (21 semanas)	Seppo y col., (2003)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	IPP (2,4-2,7 mg) VPP (2,4-2,7 mg)	Hipertensión moderada	-16 mmHg (8-10 semanas) -11 mmHg (5-7semanas)	Tuomilehto y col., (2004)
PéptidoC12 (Hidrolizado de proteínas de leche bovina que contiene α_{s1} - caseína (23-34) \pm ácido alginico)	FFVAPFEVFGK (100-200 mg) Ácido Alginico (877-1754 mg)	Hipertensos	-9 mmHg (y 6 mmHg DBP) a las 6 h comparando con 2 h, a dosis altas de ácido alginico	Townsend y col., (2004)
Dodecapéptido DP (Hidrolizado triptico de un hidrolizado de caseínas enriquecido en α_{s1} -caseína (23-34))	200 mg de hidrolizado	Hipertensión moderada	-6 mmHg (4 semanas)	Sugai (1998)
Biozate 1 (Hidrolizado de proteínas de suero)	20 g de hidrolizado	Hipertensos	-11 mmHg (-7mmHg DBP) comparando con el control.	Pins y Keenan, (2003)

Tomado de López-Fandiño y col., 2006

3.6. Estrategias para la purificación e identificación de péptidos con actividad IECA

La identificación de péptidos bioactivos en alimentos presenta una serie de dificultades que limitan mucho el conocimiento sobre la liberación de los péptidos bioactivos a partir de sus proteínas precursoras. Estas dificultades se deben por un lado a la complejidad de la matriz y por otro a las bajas concentraciones a las que se encuentran los analitos a analizar, por ello es necesario llevar a cabo etapas de purificación y concentración de los péptidos de interés. La ultrafiltración es una técnica que se ha empleado con éxito para la obtención de fracciones enriquecidas en péptidos antihipertensivos procedentes de las proteínas lácteas (Gómez-Ruiz y col., 2004a; Hernández-Ledesma y col., 2004a; Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Mullally y col., 1997; Maeno y col., 1996; Nakamura y col., 1995a). Los péptidos biológicamente activos suelen tener entre 3 y 20 aminoácidos (Pihlanto-Leppälä, 2001), y la mayoría de los péptidos con actividad IECA descritos hasta el momento son de pequeño tamaño. También es útil para llevar a cabo una preconcentración de los péptidos inhibidores de la ECA la utilización de cartuchos en fase inversa C_{18} (Curtis y col., 2002; Hernández-Ledesma y col., 2005; Yamamoto y col., 1999) o la realización de una etapa previa de cromatografía de exclusión molecular (Pihlanto-Leppälä y col., 2000).

Las técnicas de cromatografía líquida rápida de proteínas y de HPLC en fase inversa tanto analítica como preparativa se utilizan para llevar a cabo la separación y concentración de los péptidos. Los equipos de HPLC permiten la separación de los componentes de mezclas complejas y dan información sobre los tiempos de retención de dichos componentes. Posteriormente la identificación de los péptidos se lleva a cabo mediante el análisis secuencial del extremo amino-terminal (Maeno y col., 1996; Nakamura y col., 1995a; Ryhänen y col., 2001; Ashar y Chand., 2004b; Pan y col., 2005), mediante espectrometría de masas combinada con el análisis secuencial del extremo amino-terminal (Leppälä y col., 1998; Saito y col., 2000; Minervini y col., 2003; Didelot y col., 2006) o mediante espectrometría de masas (Haileselassie y col., 1999; Gobbetti y col., 2004). El desarrollo de las técnicas de HPLC acopladas a espectrometría de MS/MS (**HPLC-MS/MS**) ha hecho posible el análisis de péptidos en

mezclas complejas sin necesidad de llevar a cabo una separación previa de los componentes (Papayannopoulos, 1995). Estas técnicas analíticas son muy útiles a la hora de identificar péptidos bioactivos en matrices complejas como son los hidrolizados de proteínas alimentarias o los productos fermentados. Hasta el momento, no se han realizado muchos estudios donde la técnica de HPLC-MS/MS se utilice en identificación de péptidos con actividad IECA. En nuestro grupo de investigación esta técnica se ha empleado para identificar péptidos inhibidores de la ECA en queso Manchego (Gómez-Ruiz y col., 2002) y en distintos queso españoles (Gómez-Ruiz y col., 2006), en distintos productos fermentados comerciales (Hernández-Ledesma y col., 2004a; 2005), en diversas fórmulas infantiles (Hernández-Ledesma y col., 2004b), en un hidrolizado de β -lactoglobulina con termolisina en condiciones desnaturalizantes (Hernández-Ledesma y col., 2006) y en un hidrolizado de clara de huevo con pepsina (Miguel y col., 2005).

3.6.1. La espectrometría de masas aplicada a proteínas y péptidos lácteos

La espectrometría de masas es la técnica instrumental más completa a la hora de llevar a cabo la identificación de proteínas y péptidos. Entre las múltiples características que hacen de la espectrometría de masas una técnica analítica extraordinaria podemos citar: su alta eficacia para la identificación de moléculas, es una técnica cualitativa y cuantitativa, puede analizar muestras complejas sin necesidad de separar los componentes individuales, posee una gran sensibilidad y es una técnica muy rápida (Esteban, 1993). Hoy en día las técnicas de ionización, los sistemas de masas en tándem (**MS/MS**) y el acoplamiento de la espectrometría de masas con otras técnicas como son la cromatografía de gases, técnicas de HPLC, electroforesis capilar, etc. se usan con éxito para la elucidación estructural de las moléculas orgánicas en el análisis de alimentos.

La leche y los productos lácteos son matrices extremadamente complejas, lo que hace que la espectrometría de masas acoplada o no a otras técnicas analíticas constituya hoy en día una herramienta fundamental en el análisis de sus componentes

químicos. La aplicación de la espectrometría de masas a las proteínas de la leche y de otros productos lácteos ha permitido entre otras aplicaciones determinar variantes genéticas y modificaciones postranscripcionales, determinar la calidad de la leche durante el procesado, detectar adulteraciones y llevar a cabo la identificación de péptidos. Así, por ejemplo, la espectrometría de masas con fuente de ionización de electrospray (**ESI-MS**) se ha empleado para caracterizar dos variantes genéticas de la β -caseína bovina, la variante F (Visser y col., 1995) y la variante G (Dong y Ng-Kwai-Hang, 1998). Molle y Leonil, (1995) mediante ESI-MS pudieron identificar hasta 18 especies moleculares distintas de una misma variante genética de caseinmacropéptido. Estas especies se diferencian en el grado de glicosilación y también en el grado de fosforilación.

La espectrometría de masas también se ha empleado para determinar la calidad de la leche en el procesado, y para poder detectar adulteraciones. Así, la espectrometría de masas con fuente de ionización de desorción mediante laser inducida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (**MALDI-TOF**) se ha utilizado para detectar la degradación térmica y para determinar el contenido de proteína de diferentes muestras de leche sometidas a distintas condiciones de pasteurización (70°C-90°C, 10-30 s) y de esterilización (140°C-150°C, 2-5 s) (Catinella y col., 1996a, 1996b). La detección de adulteraciones, como la adición de leche bovina a leche de búfala para la elaboración de queso Mozzarella o la adición de leche bovina a leche de oveja, se ha determinado de forma rápida y eficiente mediante MALDI-TOF (Angeletti y col., 1998; Fanton y col., 1998).

La espectrometría de masas también se ha empleado con éxito para el estudio de la formación e identificación de péptidos en productos lácteos. Así, MALDI-TOF se empleó para determinar el grado de proteólisis durante la fermentación de un yogur con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Se comprobó que la hidrólisis con el primer microorganismo era mucho mayor que con el segundo. La proteólisis aumentaba si se utilizaban las dos bacterias conjuntamente (Fedele y col., 1999). La técnica de espectrometría de masas tanto por MALDI-TOF como por ESI-MS se han utilizado para identificar péptidos en queso. MALDI-TOF permitió la

identificación de ocho péptidos en queso Cheddar que se originaban a partir de la α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína y β -caseína (Gouldsworthy y col., 1996). La ESI-MS y la ESI-MS/MS, permitieron la identificación de 25 aminoácidos en distintas etapas de maduración de un queso Cheddar y en un queso comercial Cheddar (Alli y col., 1998). Trece de los péptidos identificados derivaban de la α_{s1} -caseína, siete de la β -caseína y cinco de la κ -caseína.

Más recientemente, la técnica de espectrometría de masas se ha comenzado a aplicar a la identificación y caracterización de péptidos bioactivos. Además de la aplicación en la identificación de péptidos con actividad IECA, la espectrometría de masas es en general una herramienta de gran utilidad en el estudio de péptidos bioactivos. Vermeirssen y col., (2002b) han empleado MALDI-TOF para estudiar el transporte del péptido ALPMHIR a través de una monocapa de células Caco-2. Kuwata y col., (2001), también han empleado la espectrometría de masas para estudiar la resistencia de péptidos bioactivos derivados de lactoferrina en el tracto intestinal de ratas. La producción del tetrapéptido antihipertensivo α -lactoferrina mediante una hidrólisis continua de suero de leche de cabra en un reactor de ultrafiltración se estudió mediante espectrometría de masas (Bordenave y col., 1999). En nuestro grupo de investigación la resistencia de péptidos con actividad IECA y la formación de nuevos péptidos durante la digestión gastrointestinal se ha estudiado mediante RP-HLPC-MS/MS (Gómez-Ruiz y col., 2004a; Hernández-Ledesma y col., 2004a; 2004b).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

1.1. Leches fermentadas

1.1.1. Kefir

Se adquirieron cuatro muestras de un Kefir comercial de leche de cabra correspondientes a diferentes periodos de tiempo a lo largo del año. Según la información proporcionada por el fabricante, este producto había sido elaborado con leche pasteurizada y fermentada con gránulos de Kefir. Los gránulos contenían una mezcla de bacterias lácticas: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, y levaduras: *Kluyveromyces marxianus* var. *fragilis* (*Torula Kefir*).

1.1.2. Leches fermentadas con *Enterococcus faecalis*

La preparación de las leches fermentadas con diferentes cepas *E. faecalis* se llevó a cabo según el método descrito por Mugerza y col., 2006, en el Departamento de Investigación y Desarrollo del Grupo Leche Pascual. Estas cepas de *E. faecalis* se aislaron a partir de leche cruda y se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) denominándose CECT 5727, CECT 5728, CECT 5826 y CECT 5827. Se prepararon cultivos iniciadores incubando las distintas cepas de *E. faecalis* en leche desnatada esterilizada reconstituida al 10% (p/p) a una temperatura de 30°C durante la noche. Un 3% (v/v) de este cultivo iniciador se añadió a la leche desnatada reconstituida y se fermentó durante 48 horas a una temperatura de 30°C. El crecimiento microbiano durante la fermentación se determinó mediante recuento en

placa de agar M17 tras la incubación durante 48 horas a 30 °C. El proceso de fermentación se paró mediante un proceso de pasteurización a una temperatura de 75°C durante 1 minuto.

En los estudios de desarrollo de un método de cuantificación, las leches fermentadas se prepararon según el procedimiento descrito anteriormente (Muguerza y col., 2006). La fermentación se realizó a distintos periodos de tiempo entre 0 h y 48 h a una temperatura de 30 °C. Alternativamente, siguiendo el procedimiento anterior, los cultivos iniciadores se emplearon para inocular una leche a la que se había añadido un 10% de sacarosa, y en la que el contenido en proteína se había estandarizado con dos concentrados comerciales de proteína láctea: 1,8% (v/v) Belka DL 403 (Bel Industries, París, Francia) y 1,8% (v/v) MTM E70 (Meggler, Wasserburg, Alemania). Las leches fermentadas resultantes se analizaron de esta manera y también después de mezclarlas con distintas proporciones de un yogur líquido comercial edulcorado y aromatizado (Yosport; Grupo Leche Pascual, Aranda de Duero, Spain). Una de estas leches se enriqueció con Ca (2 g/L) (Miguel y col., 2005).

1.2. Leches humanas y fórmulas infantiles

Se obtuvieron siete muestras de leche humana correspondientes a diferentes periodos de lactación. Tres muestras (HM-1, HM-2 y HM-3) se habían recogido entre la 3^o y 4^o semana después del parto, una muestra (HM-4) se obtuvo en la 7^o semana después del parto, y las otras tres muestras (HM-5, HM-6, y HM-7) se recogieron entre las semanas 13^o y 16^o después del parto.

Las fórmulas infantiles (IF1-IF8) eran muestras comerciales en polvo elaboradas con proteínas de leche bovina. Estas fórmulas son adecuadas para la alimentación del recién nacido durante los cuatro primeros meses de vida, y su composición, y concentración proteica se encuentra recogida en la **Tabla 6**. Se prepararon soluciones de las fórmulas disolviendo las leches en polvo en agua Milli-Q[®] de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. La relación (p/v) para preparar las muestras fue: 15,6% (IF-1, IF-2 y IF-3), 14,6% (IF-4), 15% (IF-5 y IF-7) y 14,3% (IF-6 y IF-8).

Tabla 6. Composición y contenido de proteína de las fórmulas infantiles.

Fórmulas Infantiles	Composición	Concentración de proteína (g /100 g)
IF-1	Hidrolizado de α -La y caseínas	13,1
IF-2	Hidrolizado de proteínas de suero	13,3
IF-3	Leche desnatada y suero	12,0
IF-4	Proteínas de suero	12,6
IF-5	Leche desnatada y suero	13,0
IF-6	Leche desnatada, suero y proteínas lácteas	9,5
IF-7	Caseinatos	12,3
IF-8	Leche desnatada y suero	9,8

2. Obtención de la fracción soluble

El extracto soluble en agua de las leches fermentadas con diferentes cepas de *E. faecalis* se obtuvo centrifugando a 20.000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 10°C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de papel Whatman nº 40 y se determinó el pH y el IC₅₀ según se detalla en el apartado 3.

El extracto soluble en agua se fraccionó mediante ultrafiltración a través de una membrana hidrofílica de 3.000 Da de tamaño de poro (Centriprep, Amicon Inc, Beverly, MA, USA). En el permeado y el retenido obtenidos se midió el IC₅₀. Posteriormente, la fracción menor de 3000 Da se congeló, liofilizó y se mantuvo a -20°C hasta su posterior análisis.

El extracto soluble en agua de los distintos lotes de Kefir se obtuvo de la misma forma que en el caso anterior con ligeras modificaciones. Las muestras se centrifugaron a 12.000 x g, 10 minutos a 5°C. El extracto soluble en agua obtenido tras

la centrifugación y filtrado se ultrafiltró a través de una membrana de celulosa regenerada de 3000 Da de tamaño de poro y $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ de área efectiva (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). El equipo de ultrafiltración estaba conectado a una fuente de nitrógeno y constaba de una celda de ultrafiltración con agitación (model 8400, Millipore), una celda de reserva (RC 800, Millipore), y una válvula selectora de concentración (CDS10, Millipore).

3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA

La actividad IECA se midió espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Cushman y Cheung (1971), con algunas modificaciones. El compuesto empleado como sustrato de la ECA fue el Hipuril-Histidil-Leucina de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Se disolvió en un tampón borato sódico 0,1 M, con cloruro sódico 0,3 M para obtener una concentración final de 5 mM de sustrato a un pH de 8,3. A 100 μl del sustrato se le añadieron 40 μl de cada una de las muestras cuya actividad inhibitoria de la ECA se quiso determinar. Se añadió 2 mU de la enzima ECA (EC 3.4.15.1, 5.1 U/mg) (Sigma), disuelta en glicerol al 50%. La reacción se llevo a cabo a 37°C durante 30 minutos. La enzima se inactivó por descenso de pH, adicionando 150 μl de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado se extrajo con 1000 μl de acetato de etilo. Tras agitación y posterior centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 750 μl de la fase orgánica. Este volumen se evaporó por calentamiento a 95°C durante 15 minutos. El residuo de ácido hipúrico se disolvió en 800 μl de agua destilada y tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro DUR-70 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA).

La actividad inhibitoria IECA fue calculada como la cantidad de proteína soluble necesaria para inhibir el 50% de la enzima (IC_{50}). La actividad de cada muestra se determinó por triplicado, y para calcular la actividad inhibitoria de cada muestra se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad inhibitoria} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}} \times 100$$

$Abs_{control}$: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sin inhibidor.

Abs_{blanco} : Absorbancia del Hipuril-Histidil-Leucina que no ha reaccionado y que ha sido extraído con el acetato de etilo.

$Abs_{muestra}$: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA en presencia de sustancias inhibidoras.

El blanco recibió el mismo tratamiento que el resto de las muestras, pero en vez de añadir enzima se añadió agua, y el control positivo también se sometió al mismo tratamiento pero empleándose 40 μ l de agua en el lugar de la muestra.

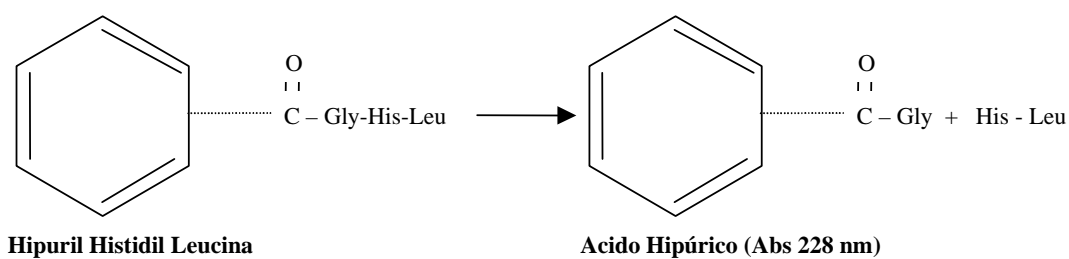


Figura 6. Reacción catalizada por la ECA, según el método de Cushman y Cheung (1971).

4. Determinación del contenido en proteína

4.1. Método Kjeldahl

El método se desarrolló según la norma IDF Estándar 20B (IDF, 1993). Se empleó un sistema de digestión Tecator y un analizador Kjeltex auto 1030, ambos adquiridos a Foss Electric S/A (Hillerod, Dinamarca). Tras la primera digestión con ácido sulfúrico concentrado a ebullición en presencia de sulfato potásico y sulfato de cobre como catalizadores y la posterior destilación por arrastre de vapor en medio alcalino, se recogió el destilado sobre una solución de ácido bórico empleando como indicador el rojo de metilo. El amoníaco recogido se valoró con HCl 0,1 N.

4.2. Método del ácido bicinconínico

El contenido proteico de las fracciones obtenidas por RP-HPLC, liofilizadas y redisueltas en agua Milli-Q, se determinó mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinconínico, empleando el ensayo de diagnóstico de Pierce (Rockford, IL, USA).

En una placa multipocillo de poliestireno (SARSTEDT, Newton, CA, USA), se añadieron 20 μ l de cada muestra y 200 μ l de reactivo de trabajo preparado mezclando los reactivos A y B del ensayo diagnóstico de trabajo en una proporción 50:1. El reactivo A se componía de carbonato y bicarbonato sódico, ácido bicinconínico y tartrato sódico en una solución de hidróxido sódico 0,1 M. El reactivo B era una solución de sulfato cúprico al 4%. El método consiste en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} por parte de las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret). La interacción del Cu^{+1} con dos moléculas de ácido bicinconínico da lugar a un complejo de color púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. La absorbancia del complejo es lineal en un rango de concentración de proteína de 20 μ g/ml a 2000 μ g/ml.

La reacción se llevó a cabo en un equipo lector fotométrico de microplato Multiskan[®] Ascent (Labsystems, Hampshire, UK), a una temperatura de 37°C durante 60 minutos, y una vez finalizada se midió la absorbancia en dicho equipo a 570 nm.

Para la curva de calibrado se prepararon concentraciones de seroalbúmina bovina de 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml, y se analizaron con la metodología anteriormente detallada.

4.3. Método Dumas

El contenido de proteína del extracto soluble en agua de las leches humanas y de las fórmulas infantiles digeridas según se describe en el apartado 9.2, se midió en el

Instituto del Frío (CSIC) mediante el método de combustión Dumas (Wiles y Gray, 1998) en un equipo automático LECO FP-2000 (LECO Corp, St. Joseph, MI, USA).

5. RP-HPLC a escala semipreparativa

El equipo empleado (Waters Series 600 HPLC; Waters Corp., Milford, MA, USA) constaba de una bomba (modelo delta 600), un controlador de gradiente (modelo 600), un inyector (modelo 717 plus), un detector de ultravioleta de longitud de onda variable (modelo 996), un colector de fracciones y un software de adquisición y procesado de datos (Millenium 3.2). La columna es una Prep Nova Pak[®] HR C₁₈ (300 x 7,8 mm d.i., 6 µm de tamaño de partícula, 60 Å de tamaño de poro) (Waters). El disolvente A es una mezcla de agua y ácido trifluoroacético (1000:1) y el disolvente B es una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (1000:0,8). El flujo fue de 4 ml/min y la absorbancia del disolvente se monitorizó a 214 nm.

Para llevar a cabo el aislamiento de las fracciones peptídicas de la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727, el permeado menor de 3000 Da procedente del proceso de ultrafiltración y liofilizado se disolvió en agua en una concentración de 100 mg/ml y se hizo pasar a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm. La muestra se eluyó con un gradiente del disolvente B del 0% al 35% en 70 minutos a 35°C. En cada análisis cromatográfico el volumen de muestra inyectado fue de 500 µl y las fracciones que se separaron se recogieron un total de 12 veces; una vez retirado el acetonitrilo se liofilizaron y se guardaron a -20°C y posteriormente se determinó la actividad IECA siguiendo el método detallado en el apartado 3.

Con el objetivo de llevar a cabo el análisis de las fracciones obtenidas con mayor actividad IECA, el extracto soluble en agua menor de 3000 Da se sometió a un segundo análisis mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. En este análisis se empleó el mismo equipo, columna y disolventes que en el caso anterior, pero la muestra se eluyó con un gradiente de disolvente B que fue isocrático al 20% durante 10

minutos y después lineal del 20% al 35% durante 40 minutos a una temperatura de 35°C.

De nuevo, el extracto soluble en agua menor de 3000 Da liofilizado se disolvió en agua en una concentración de 100 mg/ml y se hizo pasar a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm. En cada análisis cromatográfico, el volumen de muestra inyectado fue de 800 µl. Las fracciones que se separaron se recogieron un total de 24 veces y una vez retirado el acetonitrilo se liofilizaron y se guardaron a -20°C. Posteriormente se determinó la actividad IECA siguiendo el método detallado en el apartado 3.

El aislamiento de las fracciones peptídicas del Kefir se realizó de la misma forma que en el caso de de la leche fermentada con *Enterococcus faecalis* CECT 5727 con algunas modificaciones. El extracto soluble en agua menor de 3000 Da procedente del proceso de ultrafiltración, liofilizado se disolvió en agua en una concentración de 150 mg/ml. En el primer análisis cromatográfico la muestra se eluyó con un gradiente del disolvente B del 0% al 30% en 70 minutos, el volumen de inyección fue de 1200 µl y las fracciones en que se dividió el cromatograma se recogieron de 12 a 14 veces. Se realizó un segundo análisis para conseguir una mejor separación de los péptidos de las fracciones más activas. El gradiente del disolvente B fue del 8% al 20% en 45 minutos, el volumen de inyección fue de 1000 µl y las fracciones se recogieron tras 45 inyecciones.

6. Identificación de péptidos mediante RP-HPLC-MS/MS

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo HP Agilent 1100 System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con una bomba cuaternaria Agilent Series 1100. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el programa ChemStation (Agilent Technologies). Se empleó una columna en fase inversa Hi-Pore C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

El disolvente A era una mezcla de agua y ácido trifluoroacético (1000:0,37) y el disolvente B una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (1000:0,27). El equipo de HPLC estaba acoplado a un detector de masas Esquire-3000 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Las muestras se eluyeron con un flujo de 0,8 ml/minuto. Los gradientes empleados del disolvente B se optimizaron para los distintos tipos de muestras, y el volumen de inyección fue de 50 μ l o 100 μ l, dependiendo de la muestra a analizar.

La absorbancia del disolvente se monitorizó a 214 nm y a la salida del detector el flujo de 0,8 ml/min se dividió en una proporción 1:40 para dar un flujo final aproximado de 20 μ l/min hacia el nebulizador del espectrómetro de masas. El equipo utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado, y helio a una presión estimada de 5×10^{-3} bar. Los espectros de masas (MS) fueron adquiridos en un intervalo entre 50 y 1500 m/z, dependiendo del tipo de muestra. El capilar se mantuvo con un voltaje de 4 kV. La señal de los análisis de MS se obtuvo de la media de 25 espectros y para los análisis de MS/MS se utilizó el valor medio de 5 espectros. El límite de intensidad para llevar a cabo los análisis de MS/MS fue de 10.000 unidades arbitrarias. Los iones precursores se aislaron con un intervalo de 4 m/z y se fragmentaron con una rampa de voltaje entre 0,3 a 1,5 V (optimizado para cada ión).

Los datos espectrales se procesaron y transformaron a valores de masas utilizando el programa Data Analysis (version 3.0, Bruker Daltonik). El programa BioTools (versión 2.1, Bruker Daltonik) se empleó para procesar los espectros MS/MS y llevar a cabo la secuenciación de los péptidos.

7. Identificación de péptidos mediante espectrometría de MS/MS

El análisis mediante MS/MS se realizó en un equipo de trampa iónica Esquire-3000 (Bruker Daltonik). Las fracciones liofilizadas con mayor actividad IECA procedentes de la separación por HPLC a escala semipreparativa (ver apartado de 5) se disolvieron en

una concentración de 5-10 µg/ml en una mezcla de 50% de acetonitrilo en agua conteniendo 0,3% de ácido fórmico. Las muestras se inyectaron en el nebulizador de electrospray a un flujo de 4 µl/min utilizando una bomba de jeringa tipo 22 (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). El equipo emplea nitrógeno como gas nebulizador y de secado, y opera con una presión de helio de 5×10^{-3} bar. A través del capilar se aplicó un voltaje de 4 kV.

Los espectros de MS/MS se adquieren en un intervalo máximo de 50-1500 m/z dependiendo del valor m/z del ión precursor. Los iones se aislaron con un intervalo de 4 m/z y el valor de amplitud para la fragmentación dependió de las características del ión precursor pero osciló entre 0,5 y 1,3 V. La interpretación de los espectros de MS/MS para la identificación de las secuencias peptídicas se realizó con el programa Biotools 2.1 (Bruker Daltonik).

8. Síntesis de péptidos.

Se sintetizaron un total de 43 péptidos; 8 de ellos se identificaron en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727, 16 se identificaron en el kefir comercial de leche de cabra, 11 se identificaron en las muestras de leche humana digerida, 7 péptidos correspondían a modificaciones de aminoácidos en la secuencia del péptido LHLPLP y un péptido se utilizó como estándar interno en el método cuantitativo por RP-HPLC-MS/MS que se describe en el apartado 12.

La síntesis de los 8 péptidos identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727, de los 16 identificados en el kefir, y del péptido utilizado como estándar interno en el método cuantitativo de RP-HPLC-MS/MS, se realizó mediante el método Fmoc en fase sólida con un sintetizador (modelo 431A; Applied Biosystems Inc., Überlingen, Alemania). La pureza de los péptidos sintéticos se verificó mediante RP-HPLC-MS/MS según describe Gómez-Ruiz y col, 2002.

Los 11 péptidos identificados en las muestras de leche humana digerida fueron sintetizados por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA). GenScript también verificó la pureza de estos péptidos mediante RP-HPLC-MS/MS.

9. Biodisponibilidad

9.1. Simulación gastrointestinal de péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos previamente identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 y los péptidos sintéticos que se habían identificado en el kefir comercial de leche de cabra, se sometieron a un proceso enzimático en dos etapas con pepsina y Corolasa PP[®], para simular las condiciones en las que se encuentran los péptidos en el organismo antes de ser absorbidos. La Corolasa PP[®] es un preparado enzimático en polvo (Röhm Enzyme GmbH, Darmstadt, Alemania), procedente de páncreas de cerdo, que además de tripsina y quimiotripsina contiene diferentes actividades aminopeptidasa y carboxipeptidasa. La simulación gastrointestinal se llevó a cabo según el método de Alting y col., (1997) con algunas modificaciones. Los hidrolizados se prepararon a partir de una solución acuosa a pH=2 del péptido a una concentración de 10 mg/ml. Las hidrólisis se llevaron a cabo en un incubador a temperatura controlada y agitación constante (220 rpm) (Unitron, Infors AG, Bottmingen, Suiza). Las muestras se hidrolizaron primero con pepsina (EC. 3.4.23.1; 1:10.000) (Sigma) utilizando una relación enzima:sustrato 1:50, durante 90 min a 37°C y pH 2,5. A continuación se hidrolizaron con Corolasa PP[®] (Röhm Enzyme GmbH) utilizando una relación enzima:sustrato 1:25, a un pH 7-8, 37°C durante 150 min. La reacción se finalizó calentando durante 15 minutos en un baño de agua a 95 °C. El hidrolizado obtenido se centrifugó durante 30 minutos a 5 °C y 35000 x g, y se recogió el sobrenadante.

9.2. Simulación gastrointestinal de leches Humanas y fórmulas infantiles

Para llevar a cabo la digestión de las leches humanas y de las fórmulas infantiles se siguió el método de Rudloff y Lönnerdal (1992) con algunas modificaciones. Este método trata de simular el proceso de digestión gastrointestinal de los recién nacidos. En ellos la digestión tiene lugar a un pH mayor que la digestión de un adulto y además su duración es menor. La hidrólisis de las muestras se realizó en un agitador orbital con temperatura controlada a 220 rpm (Unitron). Un volumen de 20 ml para las leches humanas y de 30 ml para las fórmulas infantiles, se sometió en primer lugar a una hidrólisis con pepsina (EC. 3.4.23.1; 1:10.000) (Sigma), a un pH de 3,5 y una temperatura de 37 °C durante 30 minutos; la relación enzima:sustrato fue de 58,8 mg/g de proteína. Los digeridos se colocaron en hielo y se paró la reacción ajustando el pH a 7,0 con NaHCO_3 0,5 M. A continuación se llevó a cabo la hidrólisis con Pancreatina (Sigma), que es un preparado enzimático procedente del páncreas de cerdo, durante 60 minutos a 37 °C con una relación enzima:sustrato de 58,8 mg/g de proteína. La reacción se paró por calentamiento a 95°C durante 15 minutos, las muestras se enfriaron y se obtuvo su extracto soluble en agua centrifugando a 20.000 x g durante 30 min a 5°C. El WSE así obtenido se filtró a través de un filtro Whatman no. 41. y se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

9.3. Evaluación de la resistencia a las peptidasas del epitelio intestinal y de la absorción y mecanismo de Transporte de los péptidos LHLPLP y HLPLP.

Preparación de las soluciones estándar

Los péptidos LHLPLP y HLPLP se sintetizaron mediante el método Fmoc (ver apartado 8). Para llevar a cabo la cuantificación se preparó una recta de calibrado del péptido LHLPLP disuelto en agua Milli-Q[®] con 5 concentraciones (7,81; 3,90; 1,95; 0,97 y 0,48 µg/mL).

Cultivo de células

Los experimentos con cultivos de células se realizaron en el Servicio de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. La línea de células Caco-2 procedente de un adenocarcinoma de colon humano se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, USA). Las células se mantuvieron en el medio Dulbecco's Modified Eagle's con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y un suplemento del 10% de suero bovino fetal, un 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos, a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada con un contenido del 5% de CO₂. Las células se utilizaron entre los pases 30 y 45. Para realizar los experimentos se utilizaron placas de 6 pocillos Transwell® (Costar, Corning, NY, USA). Las células se sembraron a una densidad de 10⁵ células/cm² en una en una membrana permeable de poliéster contenida en el soporte de cada pocillo (tamaño de poro 0,4 µM, diámetro 24 mm, 4,7 cm² de superficie de crecimiento). El medio de cultivo se reemplazó cada dos días y se permitió la diferenciación celular por lo menos 21 días antes de llevar a cabo los ensayos. La integridad de cada uno de los pocillos se verificó midiendo la resistencia transepitelial eléctrica.

Estudios de transporte

Todas las soluciones se atemperaron a 37°C. Los péptidos se disolvieron en solución salina balanceada de Hank y se añadieron a la parte apical o basolateral del pocillo. La cámara se incubó a una temperatura de 37°C a diferentes tiempos según el experimento y se recogieron las soluciones de la parte apical y basolateral para su análisis por RP-HPLC-MS/MS. Glycylsarcosine se disolvió en solución salina balanceada de Hank, Worthmanin y Cytochalasin D se disolvieron en dimetilsulfóxido, y se incubaron durante 30 minutos antes de iniciar los experimentos de transporte. La concentración de dimetilsulfóxido fue del 0,044% en el medio de cultivo y esta cantidad se utilizó también en el control cuando fue necesario.

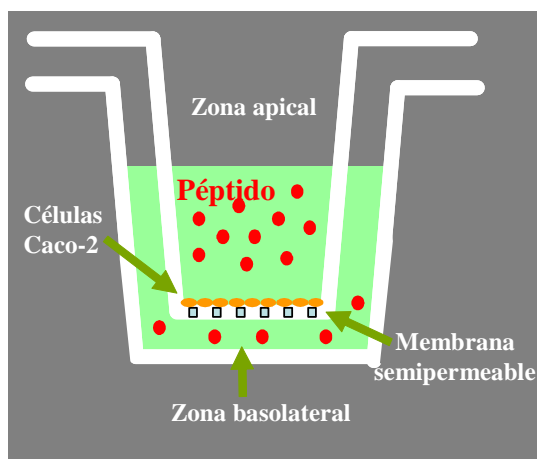


Figura 7. Esquema del pocillo Transwell®. La monocapa de células Caco-2 se siembra en la membrana semipermeable. El compartimento donde se encuentran las células se denomina zona apical y el compartimento exterior se denomina zona basolateral.

Análisis por RP-HPLC-MS

El análisis y la cuantificación de los péptidos LHLPLP y HLPLP por RP-HPLC-MS se desarrolló según el método descrito en el apartado 12, con algunas modificaciones. Para la separación por RP-HPLC se empleó una columna en fase inversa Inertsil 5 ODS3 C₁₈ (150 x 2,1 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula) (Varian, Bergen op Zoom, Países Bajos). El volumen de inyección fue de 100 µl y las muestras se eluyeron con un gradiente lineal de la fase B en la fase A (5 minutos de isocrático) del 0 al 30% en 10 minutos y del 30% a 70% en 50 minutos, a un flujo de 0,2 ml/min. El eluyente se desvió a la basura los 5 primeros minutos de análisis para evitar la contaminación del espectrómetro de masas con sales. El flujo procedente del RP-HPLC se aplicó directamente al espectrómetro de masas mediante la interfase de electrospray. Los espectros se adquirieron en un rango de masas m/z 100-750 y se hizo la media de 10 espectros para los análisis de espectrometría de masas y de 5 espectros para los análisis por espectrometría de MS/MS. El límite de señal para los análisis de espectrometría de MS/MS fue de 10000 (5% de la señal total). Los iones precursores se aislaron con una ventana de 4 m/z y se fragmentaron con una rampa de voltaje de 0,35 a 1,4 V. Las muestras se cuantificaron con la ayuda del programa QuantAnalysis 1.3 (Bruker Daltonic). Para la cuantificación del péptido LHLPLP se integró el área del

pico correspondiente a la extracción del ión precursor m/z 689,4 y a sus aductos de sodio y de potasio m/z 711,1, 727, y 733. De la misma forma, la cuantificación del péptido HLPLP se realizó mediante la integración del área del pico de HPLC-MS correspondiente al ión precursor m/z 576,3 y a sus aductos de sodio y de potasio m/z 598,3, 614,3 y 620,3.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como el valor principal \pm el error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía ANOVA y el test de Bonferroni o mediante el test de *t-student* cuando se compararon dos grupos. Los datos se consideraron significativamente distintos cuando el valor de *p* fue inferior a 0,05.

9.4. Resistencia de los péptidos LHLPLP y HLPLP a las peptidasas plasmáticas

El péptido LHLPLP se incubó con plasma de rata SHR. La reacción se realizó siguiendo el método de Matsui y col., (2000) con algunas modificaciones. El plasma de rata SHR se obtuvo tras la centrifugación de la sangre en tubos heparinizados a 3.000 x g durante 30 minutos a una temperatura de 5°C. El péptido LHLPLP se preparó a una concentración de 0,8 mM en tampón Tris-malato 0,1 M (pH 7,4) con 1 mM de Cl_2Ca . A 250 μl de la solución del péptido se añadieron 20 μl de plasma y la mezcla se incubó en un agitador orbital a 220 rpm (Unitron) con una temperatura de 37°C durante diferentes periodos de tiempo hasta 24 horas (0 h; 15 min; 30 min; 1 h; 4 h; 6 h, 8 h y 24 h). La reacción se terminó con tricloroacético (1%) y las muestras se analizaron por RP-HPLC-MS/MS.

El péptido HLPLP se incubó con plasma humano según el método de Matsui y col., 2000, modificado según se detalla anteriormente. Además, este péptido se incubó directamente en el plasma humano a una concentración de 0,4 mg/mL de plasma en un agitador orbital a 220 rpm (Unitron) con una temperatura de 37°C durante diferentes periodos de tiempo hasta 24 horas (0 h; 15 min; 30 min; 1 h; 4 h; 6 h, 8 h y 24 h). La

reacción se terminó con tricloroacético (5%) y las muestras fueron analizadas por RP-HPLC-MS/MS.

9.5. Búsqueda en plasma del LHLPLP tras su administración oral a SHR

Se suministró el péptido LHLPLP a cuatro ratas SHR a una dosis de 10 mg/kg de peso. Se tomaron muestras de sangre de dos SHR, 1 hora después de haber ingerido el péptido y a las 3 horas, y de las otras dos SHR a las 2 y a las 4 horas. También se investigó la presencia del péptido en una SHR a las 4 horas tras el sacrificio. El plasma se obtuvo tras la centrifugación de la sangre en tubos heparinizados a 3.000 x g durante 20 minutos a una temperatura de 5°C e inmediatamente se le adicionó tricloroacético al 1% para inactivar las proteasas y peptidasas. Las proteínas precipitadas se eliminaron tras la centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos a una temperatura de 5°C y la muestra se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis de las distintas muestras de plasma se realizó por RP-HPLC-MS/MS según se describe en el apartado 6. El gradiente de fase B fue del 0% al 45% en 60 minutos y el volumen de inyección fue de 50 µl. Los espectros se adquirieron en un rango de m/z de 100 a 750.

10. Estudios enzimáticos del péptido LHLPLP

En primer lugar se determinó la estabilidad del LHLPLP frente a la ECA. Para ello una disolución del péptido sintético, a una concentración de 5 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, con 0,3 M de NaCl y pH=8,3, se incubó con la enzima (6 mU/mg de péptido) durante 3 horas a 37°C, y 220 rpm en un agitador orbital, según el método de Fujita y col., (2000) con algunas modificaciones. Para parar la reacción se calentó durante 15 minutos en agua a 95°C. Posteriormente, se centrifugó durante 30 minutos a 5°C y 35.000 x g, y se recogió el sobrenadante. Se realizó un control positivo incubando 15 mU de la ECA con una disolución de 5 mg/ml de Hipuril-Histidil-Leucina. Posteriormente las muestras se analizaron por RP-HPLC-MS/MS.

A continuación se determinó el tipo de cinética de inhibición del péptido. Para ello, diferentes concentraciones de sustrato Hipuril-Histidil-Leucina (4,28; 3,05; 2,18 y 1,55 μM), se incubaron en presencia y en ausencia de 2 concentraciones diferentes de los péptidos a 37 °C durante 30 minutos, siguiendo el método de Choi y col., (2001) con algunas modificaciones. La reacción se paró mediante adicción de HCl 1 M, se extrajo el ácido hipúrico formado y se midió su absorbancia a 228 nm. La determinación de la cinética de inhibición de los péptidos se realizó a través de la representación de Lineweaver-Burk, representando la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la absorbancia a 228 nm producida por el ácido hipúrico.

11. Estudios de estructura/actividad del péptido LHLPLP

Se sintetizaron 7 péptidos con la misma secuencia que el péptido LHLPLP pero con modificaciones en el último aminoácido (LHLPLL y LHLPLR), en el penúltimo aminoácido (LHLPOP, LHLPOP y LHLPOP) y en el antepenúltimo aminoácido (LHLPLP y LHLPLP) y se determinó su IC_{50} según se describe en el apartado 3.

12. Desarrollo de un método cuantitativo por RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS

Preparación de las soluciones estándar

Los péptidos LHLPLP y GHLPLP se sintetizaron mediante el método Fmoc (ver apartado 8) con una pureza mayor del 90%. El péptido LHLPLP se disolvió a una concentración de 1 mg/ml y el péptido GHLPLP se disolvió a una concentración de 1,6 mg/ml. A partir de estas soluciones se prepararon las diferentes concentraciones de las rectas de calibrado.

Se prepararon dos rectas de calibrado: una del péptido LHLPLP disuelto en agua Milli-Q® con 6 concentraciones (250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 y 7,81 $\mu\text{g/ml}$), y la misma

recta se preparó disolviendo el LHLPLP en una leche fermentada en la que se había comprobado la ausencia de este péptido (Yosport, Pascual, S.A., Burgos, Spain).

Cuantificación mediante RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS

El análisis cuantitativo del péptido LHLPLP se realizó por RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS en el equipo descrito en el apartado 6. Las muestras se eluyeron con un gradiente de B en A del 0% al 45% en 60 minutos, el volumen de inyección fue de 50 μ l y se realizaron inyecciones por triplicado para cada concentración de la curva de calibrado, y por duplicado para el extracto soluble en agua de las leches fermentadas. Los espectros se adquirieron en un rango de 100-1000 m/z con unas condiciones de ionización y acumulación en la trampas de iones optimizadas para iones con m/z 689 (ión molecular correspondiente al péptido LHLPLP), obteniéndose la media cada 5 espectros adquiridos. Para los análisis por MS/MS del LHLPLP se utilizó un límite de intensidad de 10.000 y el ión m/z 689,4 se aisló con un intervalo de 4 m/z y se fragmentó con una amplitud de 0,3 a 2 V.

La cuantificación del péptido se llevó a cabo con la ayuda del programa QuantAnalysis 1.3 (Bruker Daltonik). Para la cuantificación por RP-HPLC-MS se integró el área del pico correspondiente a la extracción del ión precursor m/z 689.4 y de sus aductos de sodio y de potasio m/z 711.1, 727 y 733, y para la cuantificación por RP-HPLC-MS/MS se integró el área correspondiente a la extracción de los iones más intensos que se forman en la fragmentación del LHLPLP con m/z 251; 364,2; 439,2 y 574,3.

Métodos estadísticos

Los métodos estadísticos para los análisis son los siguientes: para las rectas de calibrado se emplearon regresiones lineales y polinómicas, y para el estudio de la evolución de la concentración del péptido LHLPLP con el tiempo de fermentación se empleó una regresión no lineal. Para el procesamiento de los datos se utilizaron los programas Statgraphics Plus for Windows 5.1 (Statistical Graphics Corporation,

Manugistics Inc., MD, USA, 2000, www.statgraphics.com) y GraphPad Prism for Windows 4.02 (GraphPad Software, San Diego California USA, 2004, www.graphpad.com).

13. Obtención del péptido antihipertensivo HLPLP mediante hidrólisis enzimática

Para obtener los hidrolizados se empleó como sustrato caseinato sódico (Induxtra). Se utilizaron las siguientes enzimas: pepsina (E.C. 3. 4. 23.1. tipo A, 10000 U/mg de proteína, Sigma) procedente de estómago de cerdo, quimiotripsina (E.C. 3. 4. 21. 1. tipo I-S, 44 U/mg de proteína, Sigma), Corolasa PP[®] (Röhm), Pancreatina 4XNF-P211P (Biocatalysts, Cardiff, Gales, UK) y Peptidasa 433P-P433P (Biocatalysts).

Se prepararon hidrolizados de caseinato sódico (Induxtra) con diferentes enzimas. Para las hidrólisis con quimiotripsina, Pancreatina 4XNF-P211P y Corolasa PP[®], el caseinato se disolvió en agua a una concentración del 5% (p:v) y el pH se ajustó a 7-8 con NaOH 0,5 N. La concentración de quimiotripsina fue 20 mg/gr proteína, la concentración de Pancreatina 4XNF-P211P fue 60 mg/gr proteína y la de Corolasa PP[®] fue 40 mg/gr proteína. Para la hidrólisis con pepsina el caseinato se disolvió en un tampón citrico-citrato sódico 50 mM pH 2,5, a una concentración del 2,5% (peso:volumen). Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos: 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h y 24 h. La inactivación de la quimiotripsina, la Pancreatina 4XNF-P211P y la Corolasa PP[®] se llevo a cabo mediante calentamiento a 95°C durante 15 minutos. La inactivación de la pepsina se consiguió elevando el pH a 7,0 con NaOH 1 M. Todas las muestras se analizaron por RP-HPLC-MS/MS según se describe en el apartado 6. El gradiente de fase B fue del 0% al 45% en 60 minutos y el volumen de inyección fue de 50 µl. Los espectros se adquirieron en un rango de *m/z* de 100 a 750.

Se llevó a cabo un análisis de las caseínas siguiendo el método de Visser y col., (1991), en dos caseinatos sódicos (Sodial e Induxtra), en un caseinato cálcico (Sodial)

y en el producto Promilk 852. Las muestras se analizaron en el equipo de RP-HPLC descrito en el apartado 6.

Para estudiar el efecto de las enzimas la Corolasa PP[®] (Röhm) y Peptidasa 433P-P433P (Biocatalysts) y del tiempo en la concentración producida por hidrólisis de caseinato del péptido HLPLP se realizó un diseño experimental cúbico centrado en las caras. Se llevaron a cabo un total de 17 experimentos: 8 puntos de un diseño factorial completo 2^3 , 8 que corresponden a los puntos del centro de las caras y 3 puntos centrados para verificar los errores experimentales. Mediante el empleo de este diseño, los 3 factores se ensayaron a 3 niveles experimentales: la Corolasa PP[®] a 20, 40 o 60 mg/g de proteína, la Peptidasa 433P-P433P a 0, 10 o 20 mg/g y el tiempo de hidrólisis a 4, 14 y 24 horas. Estos niveles se corresponden con los códigos: -1, 0 y +1, respectivamente. La variable respuesta seleccionada fue la concentración de péptido HLPLP expresada como el área del pico correspondiente a la extracción del ión precursor del péptido HLPLP con m/z 576,3 y de sus aductos de sodio y de potasio 598,3, 614,3 y 620,3 obtenida mediante el análisis de las muestras por RP-HPLC-MS/MS.

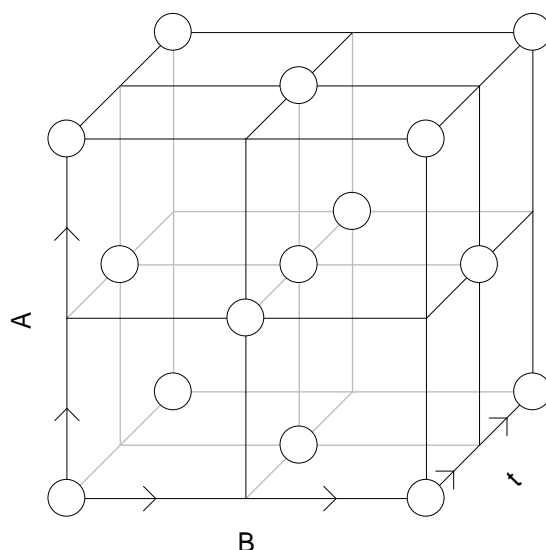


Figura 8. Representación gráfica para los experimentos del diseño experimental cúbico centrado en las caras para los factores Corolasa PP[®] (A), Peptidasa 433P-P433P (B) y tiempo (t).

El modelo propuesto para estudiar la variable respuesta (Y) fue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3t + \beta_{12}AB + \beta_{13}At + \beta_{23}Bt + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}t^2$$

Donde A es la concentración de Corolasa PP[®], B es la concentración de Peptidasa 433P-P433P y t es el tiempo. β_0 es la constante, β_1 , β_2 y β_3 los coeficientes de los términos lineales y β_{12} , β_{13} , β_{23} , β_{11} , β_{22} y β_{33} son los coeficientes de los términos cuadráticos. Los parámetros del modelo se estimaron mediante regresión lineal múltiple usando el programa Modde versión 5.0 (Umetrics AR, Umca, Suecia). Se analizó el efecto de cada término del modelo y su significación estadística. Los términos significativamente distintos de cero ($p > 0,10$) se excluyeron del modelo y los parámetros se recalcularon. El ajuste del modelo se evaluó con el coeficiente de determinación (R^2) y con la desviación estándar residual (RSD).

14. Médida de la actividad antioxidante. Ensayo ABTS

La actividad antioxidante de los péptidos identificados en la leche humana se determinó mediante el ensayo ABTS siguiendo el método de Re y col., (1999) modificado por Hernández-Ledesma y col., (2005). El radical 2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] sal de diamonio (ABTS, Aldrich Chemie, Munich, Germany) ($ABTS^{\bullet+}$), se formó tras la reacción de una solución 7 mM de ABTS con 2,45 mM de persulfato potásico (concentración final en 10 ml de agua Milli-Q[®]) a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 12-16 horas. La solución de $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó in tampón fosfato salino (pH 7,4) hasta alcanzar una absorbancia medida a 30°C y 734 nm de 0,70 ($\pm 0,02$). A 20 μ l de muestra se añadieron 2 ml de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ y la absorbancia a 734 nm y 30°C de temperatura se monitorizó durante 10 minutos. Como antioxidante de referencia se empleó el Trolox (Aldrich Chemie) que se preparó en tampón fosfato salino a distintas concentraciones entre 0 y 0,8 μ g/ml. Como control del ensayo se utilizó tampón fosfato salino en lugar de la muestra. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

La actividad antioxidante de una muestra se expresó como capacidad antioxidante equivalente al trolox (**TEAC**). Para llevar a cabo la determinación del TEAC se calcularon dos rectas, una para la muestra y otra para el Trolox, en las que se representó el porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm, a los 10 minutos de incubación de la reacción, frente a las distintas concentraciones.

El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición de la absorbancia} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{control}}$: Absorbancia del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en ausencia de antioxidante.

$\text{Abs}_{\text{muestra}}$: Absorbancia del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en presencia de sustancias antioxidantes.

El TEAC es el valor de la pendiente de la recta que se obtiene para la muestra dividida por la pendiente de la recta obtenida para el Trolox.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD IECA EN KEFIR DE LECHE DE CABRA

En este capítulo se ha estudiado la actividad IECA en kefir comercial de leche de cabra. Se han aislado e identificado los péptidos inhibidores de la ECA incluidos en el permeado de 3000 Da del extracto soluble en agua de este producto fermentado. El aislamiento de los péptidos se ha realizado mediante dos etapas de cromatografía y posteriormente se han secuenciado por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Además, se ha realizado una simulación de la digestión gastrointestinal para evaluar la resistencia de los péptidos identificados a las enzimas digestivas o la formación de nuevos péptidos con actividad.

Actividad IECA de las fracciones del kefir de leche de cabra

Se adquirieron cuatro muestras de un kefir comercial de leche de cabra correspondientes a diferentes periodos de tiempo a lo largo del año. Una de estas muestras se eligió para llevar a cabo la identificación de los péptidos. Se calculó la actividad IECA del extracto soluble en agua del kefir y se obtuvo un valor de IC_{50} de $0,365 \pm 0,029$ mg/mL. Esta actividad fue moderada, aunque mayor que la encontrada para otros productos lácteos como por ejemplo la actividad de suero procedente de una leche fermentada enriquecida en caseína (IC_{50} comprendido entre 0,6 y 1,1 mg/mL) (Leclerc y col., 2002) o la actividad de una leche desnatada hidrolizada con la proteasa B de *Saccharomyces cerevisiae* ($IC_{50} = 0,42$ mg/mL) (Roy y col., 2000). Hasta el momento los péptidos antihipertensivos más potentes se han aislado a partir de leches fermentadas con *Lactobacillus helveticus* (Yamamoto y col., 1999; Sipola y col., 2002) y en combinación con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura y col., 1995). La actividad inhibitoria encontrada para el kefir podría deberse a la acción combinada durante la fermentación de varias bacterias ácido lácticas y levaduras.

Se obtuvo el permeado de 3000 Da del extracto soluble en agua del kefir y se determinó su actividad IECA. La actividad ($IC_{50} = 0,380 \pm 0,023$ mg/mL) fue similar a la determinada en el extracto soluble en agua total y mayor que la encontrada en el retenido ($1,25 \pm 0,063$ mg/mL). Estos resultados revelan que los péptidos de pequeño tamaño son los principales responsables de la actividad IECA del extracto soluble en agua del kefir de leche de cabra.

Con el objetivo de identificar los péptidos con actividad IECA presentes en el kefir caprino, el permeado de 3000 Da se sometió a un análisis por RP-HPLC a escala semipreparativa según se describe en el apartado 5 de materiales y métodos. La **Figura 9A** muestra el cromatograma obtenido que se dividió en 8 fracciones (F1 a F8) y los valores de IC_{50} de las 8 fracciones recogidas. Todas las fracciones mostraron actividad IECA, con valores de IC_{50} desde 21,8 hasta 416,0 μ g/mL. Para todas las medidas se obtuvo un error estándar menor al 10%. Las fracciones F5, F6 y F7, fueron las que presentaron mayor actividad IECA con valores de IC_{50} de 21,8, 60,1 y 58,7 μ g/mL, respectivamente. Estas fracciones se seleccionaron para llevar a cabo la identificación de los péptidos.

El análisis por RP-HPLC de la fracción F5 mostró que esta fracción era demasiado compleja para llevar a cabo la identificación por RP-HPLC-MS/MS, por lo que el permeado de 3000 Da se sometió a un segundo análisis por RP-HPLC semipreparativo para poder eluir los péptidos contenidos en la fracción F5 con un gradiente más lento de acetonitrilo. Se recogieron 5 subfracciones (F5.1 a F5.5) y se determinó su concentración de proteína y su actividad IECA (**Figura 9B**). Los valores de IC_{50} de las tres primeras subfracciones (F5.1, F5.2 y F5.3) se encontraban entre 48,2 y 91,6 μ g/mL. Esta actividad IECA fue menor que la encontrada para la fracción F5 total. Sin embargo, se observó un potente efecto inhibitorio para las fracciones F5.4 y F5.5, que presentaron valores de IC_{50} similares (8,1 μ g/mL). La identificación de los péptidos se llevó a cabo en las subfracciones con mayor actividad IECA y en las fracciones F6 y F7.

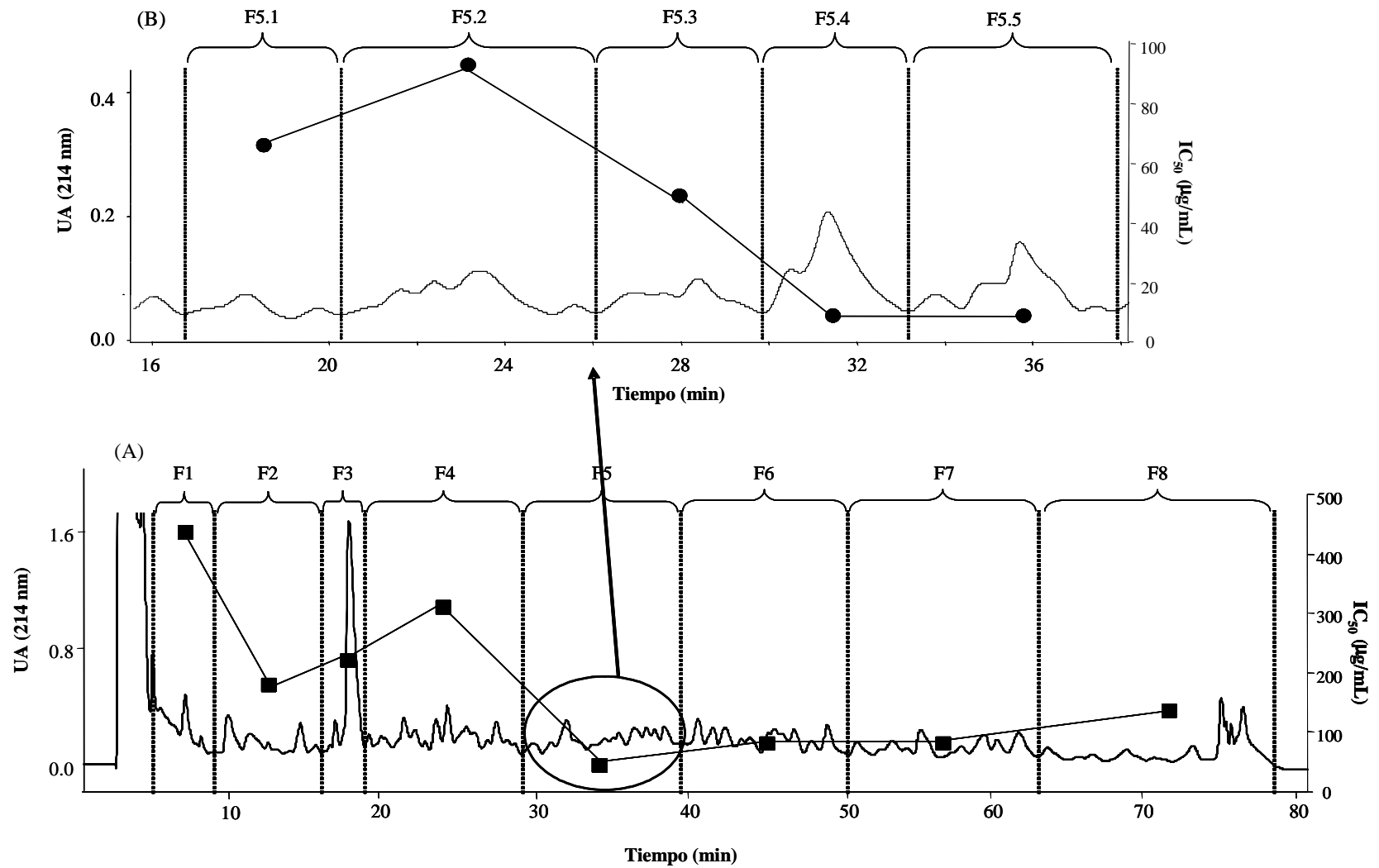


Figura 9. Fraccionamiento del extracto soluble en agua menor de 3000 Da del kefir comercial de leche de cabra obtenido mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. Se recogieron 8 fracciones que se encuentran designadas con la letra F y el número correspondiente (F1-F8) y actividad IECA de las fracciones recogidas expresada como IC₅₀ ■. (B) Cromatograma de ultravioleta obtenido mediante el análisis de la fracción 5 (F5, Figura 9A), y actividad IECA, expresada como IC₅₀ ●, de las 5 subfracciones recogidas que se designaron como F5 más el número correspondiente.

Identificación de los péptidos inhibidores de la ECA por RP-HPLC-MS/MS

Con el objetivo de identificar los péptidos con actividad IECA, las subfracciones F5.4 y F5.5, y las fracciones F6 y F7 se analizaron por RP-HPLC-MS/MS. Las fracciones más activas se eluyeron con un gradiente del solvente B en A del 13% al 31% en 70 min, y los péptidos incluidos en las subfracciones se eluyeron con un gradiente lineal del solvente B del 8 al 20% en 45 min. Para llevar a cabo la secuenciación de los péptidos se consideraron todos los iones de la corriente total de iones que dieron una señal superior a 10000 unidades. Sólo algunos iones y sus correspondientes espectros de fragmentación no pudieron asignarse a ningún fragmento originado por hidrólisis de las caseínas durante la fermentación péptidos procedentes de la lisis celular de las bacterias y levaduras implicadas en el proceso de fermentación. A modo de ejemplo, la **Figura 10A** muestra el espectro de masas de un pico cromatográfico de la subfracción F5.4, y la **Figura 10B** muestra el espectro de MS/MS del ión con carga simple con m/z 698,3 y la secuencia de aminoácidos del péptido identificado. En este espectro de MS/MS los fragmentos más intensos correspondieron a los iones y_2 , b_2 , y_4 y b_4 . Los iones y_2 y b_4 se forman por la ruptura del enlace Val-Pro. Recientemente, se ha publicado un estudio en el que los ratios más abundantes de la ruptura del enlace N-terminal adyacente a Pro se observan cuando el residuo anterior a la Pro es Val, His, Asp, Ile o Leu (Breci y col., 2003). Además, la presencia de una Lys en el extremo C-terminal del péptido favorece la presencia de iones tipo y en el espectro.

La búsqueda de las masas y secuencias parciales se realizó utilizando una base de datos con las proteínas de la leche de cabra y sus diferentes variantes genéticas. Siguiendo esta metodología se identificaron 16 péptidos en las 4 fracciones analizadas, de las cuales 10 correspondían a la β -caseína, 5 eran fragmentos de la α_{s1} - y α_{s2} -caseína, y uno era un fragmento de la κ -caseína (**Tabla 7**).

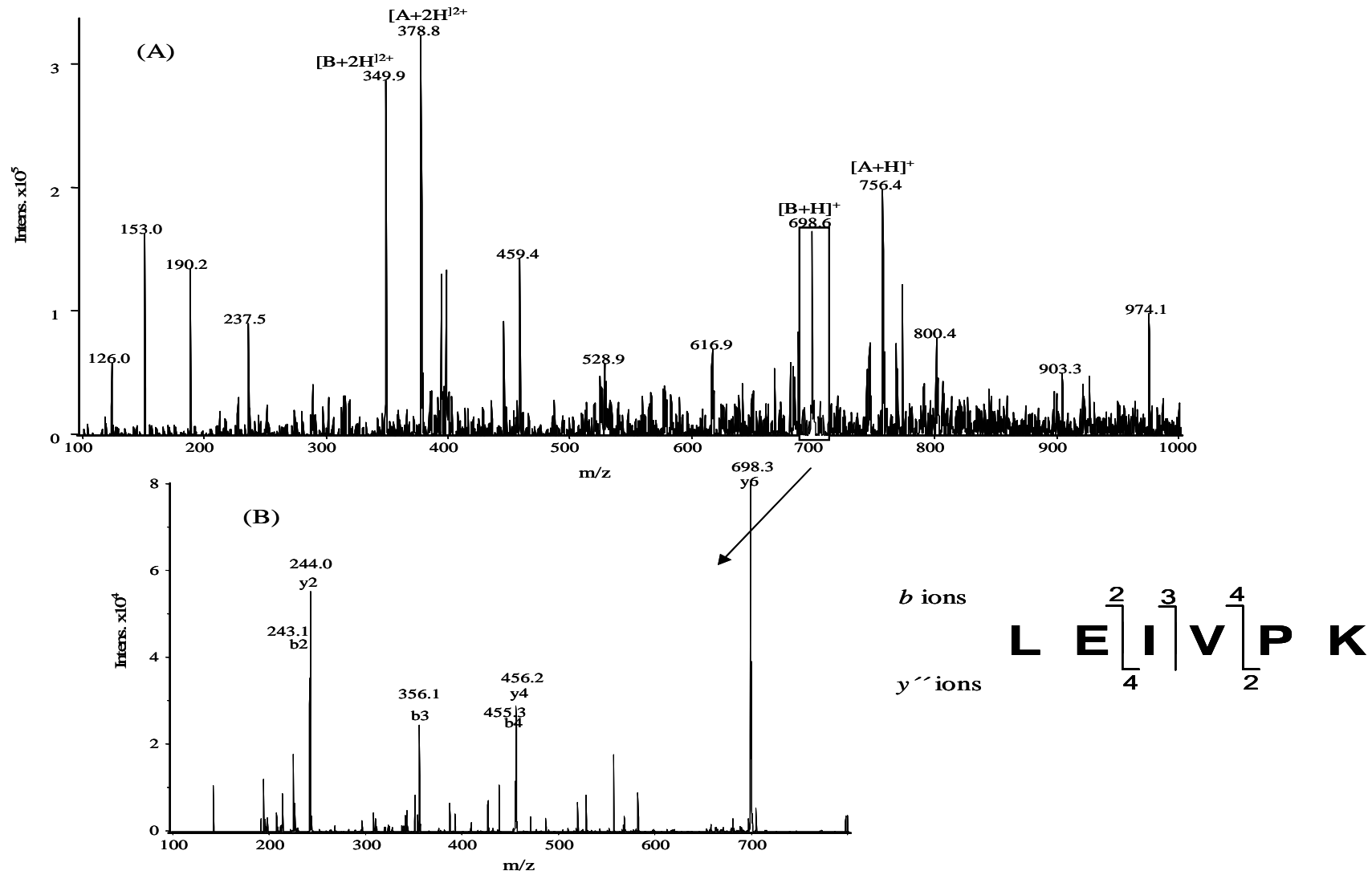


Figura 10. (A) Espectro de masas de un pico cromatográfico de la subfracción F5.4 procedente del permeado de 3000 Da del extracto soluble en agua del kefir comercial de leche de cabra. **(B)** Espectro de MS/MS del ión m/z 876,6. La interpretación del espectro de MS/MS y la búsqueda en la base de datos permitió asignar este espectro al fragmento α_{s1} -caseína (109-114).

Ninguno de los fragmentos identificados procedía de las proteínas del suero, debido probablemente a que estas proteínas poseen baja susceptibilidad a la acción proteolítica de las enzimas de las bacterias ácido lácticas. Una vez identificados los péptidos de las fracciones más activas procedentes de una de las muestras de kefir se investigó la presencia de los mismos en el este producto procesado en distintos momentos a lo largo del año. Para ello se analizaron los extractos solubles en agua de las muestras por RP-HPLC-MS/MS, y se llevó a cabo la extracción de los iones característicos de cada péptido. De este modo, se pudo determinar la presencia de todos los péptidos identificados en la **Tabla 7** en el resto de las muestras de kefir.

Actividad IECA de los péptidos identificados

Los péptidos identificados se sintetizaron químicamente y se determinó su valor de IC_{50} (**Tabla 7**). Como se observa en la tabla cinco de los 16 péptidos identificados no presentaron actividad IECA ya que su valor de IC_{50} fue superior a 1000 μM . Otros 5 péptidos mostraron una moderada actividad, con valores de IC_{50} comprendidos entre 342 y 464 μM . El tripéptido C-terminal de estos péptidos (β -caseína (94-105), β -caseína (203-209) y κ -caseína (119-123)) corresponde a zonas de las proteínas caprinas que difieren de las proteínas bovinas y ovinas. Como ejemplo, el péptido GPFPILV, procedente de la β -caseína caprina, contiene Leu en penúltima posición y posee un IC_{50} de 424,0 μM . Sin embargo, el péptido LLYQQPVLGPVRGPFPIIV, obtenido por la hidrólisis de la β -caseína bovina con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790, contiene Ile en penúltima posición y presenta un valor de IC_{50} de 22 μM (Yamamoto y col., 1994). La actividad IECA tan diferente encontrada en estos péptidos se debe a las diferencias que presentan las secuencias caprinas y bovinas. De forma similar, Kohmura y col., (1990) documentaron la importante contribución de los cambios en la secuencia aminoacídica de la β -caseína de distintas especies (vaca, oveja, búfala, rata, ratón y humana) para la actividad IECA de los péptidos procedentes de la mismas.

Seis de los péptidos identificados mostraron una potente actividad IECA con valores de IC_{50} desde 2,4 a 223,2 μM (**Tabla 7**). Dos de ellos serían los principales responsables de la actividad IECA que presenta el permeado del extracto soluble del kefir caprino.

Tabla 7. Identificación de los péptidos incluidos en las fracciones con actividad IECA procedentes del extracto soluble en agua del kefir caprino recogidas mediante RP-HPLC a escala semipreparativa y actividad IECA expresada como IC₅₀ (concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de las actividad de la enzima) de los péptidos sintéticos.

No. ^a	Masa Experimental	Masa Calculada ^b	Fragmento	Secuencia	IC ₅₀ (μM)
F5.4	697,3	697,4 ± 0,06	α _{s1} -CN f(109-114)	LEIVPK	> 1000
	755,8	755,4 ± 0,08	β-CN f(47-52)	DKIHPPF	> 1000
	1038,3	1038,4 ± 0,02	β-CN f(48-56)	KIHPPFAQAQ	132,6 ± 14,1
F5.5	741,2	741,5 ± 0,08	α _{s1} -CN f(97-102)	QLLKLK	342,4 ± 32,1
	958,2	958,3 ± 0,04	β-CN f(6-14)	LNVVGETVE	> 1000
	1311,4	1311,5 ± 0,04	β-CN f(94-105)	GVPKVKETMVPK	376,1 ± 36,9
	1448,4	1448,5 ± 0,08	β-CN f(94-106)	GVPKVKETMVPKH	223,2 ± 21,3
F6	526,2	526,4 ± 0,04	κ-CN f(119-123)	IPAIN	432,6 ± 41,6
	741,4	741,5 ± 0,04	β-CN f(203-209)	GPPFPILV	424,0 ± 42,4
	775,3	775,5 ± 0,05	α _{s2} -CN f(174-179)	KFAWPQ	177,1 ± 14,9
	1022,3	1022,5 ± 0,02	β-CN f(63-72)	TGPIPNSLPQ	> 1000
F7	425,1	425,2 ± 0,02	β-CN f(60-62)	YPF	> 1000
	598,3	598,4 ± 0,04	β-CN f(50-54)	HPFAQ	465,0 ± 43,4
	790,3	790,4 ± 0,06	α _{s1} -CN f(18-23)	ENLLRF	82,4 ± 8,9
	809,3	809,4 ± 0,07	α _{s2} -CN f(203-208)	PYVRYL	2,4 ± 0,2
	1216,4	1216,5 ± 0,01	β-CN f(58-68)	LVYPFTGPIP	27,9 ± 2,3

^a Numeración de las fracciones como se indica en las **Figuras 9A y 9B**

^b Masa monoisotópica

El fragmento 58-68 de la β -caseína, LVYPFTGPIP (IC₅₀ = 27, 9 μ M), mostraba una gran homología con un péptido descrito previamente como potente inhibidor de la ECA en queso Gouda (Saito y col., 2000). El péptido más activo identificado en este estudio, con secuencia PYVRYL, corresponde al fragmento 203-208 de la α _{s2}-caseína y su valor de IC₅₀ fue de 2,4 μ M (**Tabla 7**). Esta actividad fue mayor que la mostrada por los péptidos inhibidores de la ECA IPP y VPP (Nakamura y col., 1995). Asimismo, la actividad IECA del péptido PYVRYL también fue mayor que la que presentó el tetrapéptido VRYL (IC₅₀ = 24,1 μ M) que fue aislado por Gómez-Ruiz y col., (2004) a partir del permeado del extracto soluble en agua de un queso Manchego madurado durante 8 meses. Este hecho puede deberse a la contribución del dipéptido N-terminal PY en el incremento de la actividad IECA del péptido PYVRYL.

Con el objetivo de evaluar el efecto *in vivo* de los dos péptidos que habían presentado una actividad IECA muy elevada, PYVRYL y LVYPFTGPIP, el grupo de la Dra. Aleixandre (Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, UCM) evaluó el efecto de estos fragmentos sobre la presión arterial en SHR a una concentración de 3 mg/kg. Tras administrar cada uno de los péptidos oralmente a través de una sonda intragástrica se observó que el fragmento de secuencia PYVRYL ocasionaba una disminución significativa de la presión arterial sistólica (**PAS**) y de la presión arterial diastólica (**PAD**) en estos animales. La disminución de estas variables era máxima a las 4 horas después de la administración del péptido. La disminución presentaba además un curso temporal semejante a la disminución del PAS y de PAD producida por la administración de captopril (fármaco inhibidor de la ECA con probado efecto antihipertensivo). Estos resultados demostraron que el péptido identificado PYVRYL tenía un claro y pronunciado efecto antihipertensivo cuando se suministraba de forma aguda por vía oral a dosis de 3 mg/kg. El péptido LVYPFTGPIP también presentó una significativa disminución de la PAS similar a la que presentó el péptido PYVRYL pero a dosis de 10 mg/kg.

Cabe destacar, que el péptido PYVRYL se forma también por hidrólisis de la α_{s2} -caseína ovina con pepsina y que es una secuencia muy conservada en las especies ovina, bovina y caprina. López-Exposito y col., (2006) han demostrado que este fragmento presenta actividad antibacteriana frente a varios microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Además de actividad IECA, antihipertensiva y antibacteriana, la secuencia PYVRYL posee una potente actividad antioxidante lo que hace que esta secuencia puede considerarse un claro ejemplo de péptido multifuncional. Este péptido ha sido recientemente patentado por nuestro grupo de investigación (Recio y col., 2005).

Simulación gastrointestinal de los péptidos sintéticos

Para estudiar el comportamiento de los péptidos identificados en el kefir de leche de cabra durante la digestión gastrointestinal, los péptidos sintéticos se sometieron a un proceso de dos etapas de hidrólisis para simular las condiciones fisiológicas. Con el objetivo de identificar los fragmentos liberados por la acción de las enzimas digestivas los hidrolizados se analizaron por RP-HPLC-MS/MS (**Tabla 8**). Cuatro de los 16 péptidos no fueron hidrolizados por las enzimas digestivas, por lo tanto permanecieron intactos en el hidrolizado final y la actividad IECA de estos hidrolizados no varió. Tres de estos péptidos contenían Pro en penúltima posición, lo que podría explicar la resistencia de los péptidos a la acción de las enzimas proteolíticas. De la misma forma, algunos péptidos identificados en queso Manchego que contenían Pro en el extremo C-terminal o en penúltima posición resistieron la incubación con pepsina y un extracto de pancreatina (Gómez-Ruiz y col., 2004).

El péptido DKIHFP fue hidrolizado parcialmente por las enzimas digestivas detectándose una pequeña cantidad del péptido en el hidrolizado final. Sin embargo, el principal constituyente de este hidrolizado fue el fragmento DKIHP, liberado tras la acción de las enzimas digestivas en el enlace C-terminal del péptido DKIHFP. La actividad IECA aumentó considerablemente tras la simulación, y el valor del IC_{50} del péptido digerido fue 8 veces menor que el encontrado para el péptido sin hidrolizar. El fragmento DKIHP que contiene Pro como residuo C-terminal podría ser el responsable de la alta actividad IECA observada.

Tabla 8. Comportamiento de la actividad IECA de los péptidos identificados en el permeado de 3000 Da procedente del extracto soluble en agua del kefir comercial de leche de cabra en condiciones de simulación gastrointestinal. Secuencia y actividad IECA de los péptidos liberados después de la digestión.

Secuencia	IC ₅₀ (mg/mL) ^a		Grado de hidrólisis	Fragmentos liberados después de la digestión
	Antes de la digestión	Después de la digestión		
LEIVPK	> 1	> 1	No hidrolizado	LEIVPK
IPAIN	0.228 ± 0.022	0.228 ± 0.022	No hidrolizado	IPAIN
KFAWPQ	0.137 ± 0.011	0.137 ± 0.011	No hidrolizado	KFAWPQ
YPF	0.394 ± 0.038	0.394 ± 0.038	No hidrolizado	YPF
DKIHPP	> 1	0.233 ± 0.023	Parcialmente hidrolizado	DKIHPP; DKIHP
LNVVGETVE	> 1	> 1	Parcialmente hidrolizado	LNVVGETVE; LNVVGE; LNVV; NVVGE; NVVGETVE
GPFILV	0.314 ± 0.031	0.677 ± 0.062	Parcialmente hidrolizado	GPFILV; GPFIL; GPFPI
LVYPFTGPIPN	0.034 ± 0.003	0.068 ± 0.003	Parcialmente hidrolizado	LVYPFTGPIPN; LVYP; TGPIPN
KIHPFAQAQ	0.138 ± 0.015	0.215 ± 0.013	Hidrolizado	KIHP
QLLKLK	0.254 ± 0.024	> 1	Hidrolizado	KLK
GVPKVKETMVPK	0.493 ± 0.048	> 1	Hidrolizado	VKETMVPK; ETMVPK; TMVPK; VKET; PK
GVPKVKETMVPKH	0.323 ± 0.031	> 1	Hidrolizado	VKETMVPK; ETMVPK; TMVPK; VKET; PK
TGPIPNSLPQ	> 1	> 1	Hidrolizado	SLPQ; TGPIPN
HPFAQ	0.278 ± 0.026	> 1	Hidrolizado	HPFA; FAQ
ENLLRF	0.065 ± 0.007	0.406 ± 0.044	Hidrolizado	ENL
PYVRYL	0.002 ± 0.0001	0.086 ± 0.009	Hidrolizado	PYV

^a Concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de actuación de la ECA

Otros 3 péptidos se hidrolizaron también parcialmente, pero la actividad IECA final de los hidrolizados fue similar o ligeramente inferior que la determinada para los péptidos sin hidrolizar. Por ejemplo, la actividad del péptido LVYPFTGPIPN disminuyó aproximadamente dos veces, siendo los valores de IC_{50} del péptido antes y después de la digestión de 0,034 y 0,068 mg/mL, respectivamente. El descenso de la actividad puede deberse a la formación del fragmento TGPIPN que se ha identificado recientemente en un hidrolizado de leche de cabra con la proteinasa comercial Subtilisin Alcalasa[®] y cuya actividad IECA se calculó mostrando un valor de IC_{50} de 316 μ M (Geerlings y col., 2006), muy inferior al valor de IC_{50} de su secuencia precursora LVYPFTGPIPN ($IC_{50} = 27,9 \mu$ M). Cabe destacar, la capacidad del péptido TGPIPN para atravesar en pequeñas cantidades una monocapa de células Caco-2 (Geerlings y col., 2006), por lo que esta secuencia podría ser la responsable del efecto antihipertensivo observado tras la administración del péptido LVYPFTGPIPN a SHR.

Los otros péptidos identificados en las fracciones activas del kefir caprino fueron hidrolizados completamente por las enzimas digestivas, liberándose fragmentos de pequeño tamaño. Algunos de los péptidos que se encontraron en los hidrolizados eran similares o compartían una gran homología con péptidos previamente identificados en nuestro laboratorio tras la simulación de la digestión de leches bovinas fermentadas. Por ejemplo, el fragmento GPFPI procedente del péptido GPFPILV se encontró también en una leche fermentada comercial de origen bovino hidrolizada con pepsina y Corolasa PP (Hernández-Ledesma y col., 2004a). El péptido VKETMVPK, incluido en los hidrolizados de los péptidos GVPKVKETMVPK y GVPKVKETMVPKH, era similar, excepto por dos aminoácidos, al fragmento 98-105 de la β -caseína bovina que había sido previamente identificado en una leche bovina inoculada con *Lactobacillus rhamnosus* e hidrolizada con enzimas digestivas (Hernández-Ledesma y col., 2004b). Se observó una reducción de la actividad IECA tras la digestión de los 8 péptidos que se hidrolizaron totalmente. Sin embargo, tras la hidrólisis de la secuencia más activa identificada en el kefir, PYVRYL, el descenso de la actividad fue moderado pasando de un valor de IC_{50} 0,002 a 0,086 mg/mL. En el hidrolizado final solo se encontró el fragmento PYV. La pérdida de la secuencia C-terminal RYL podría ser la responsable del descenso de la actividad. La importancia de la Leu en posición C-terminal para la actividad IECA se confirmó por Gómez-Ruiz y col. (2004). Con el objetivo de comprobar

si realmente la secuencia PYV presentaba una actividad menor que el PYVRYL, se sintetizó químicamente y se determinó su IC_{50} obteniéndose un valor de $640,9 \pm 19,4$. Aunque esta actividad era aproximadamente 270 veces menor que la encontrada para el PYVRYL, el péptido PYV mostró un efecto antihipertensivo similar al PYVRYL cuando se suministró a SHR. Podría ser que el péptido PYV actuara mediante un mecanismo de acción diferente a la inhibición de la ECA.

En conclusión, esta parte del trabajo se describe la actividad IECA en kefir elaborado con leche de cabra. Aunque el kefir presentó una actividad moderada, se identificaron dos péptidos, con secuencias PYVRYL y LVYPFTGPIPN, que mostraron una potente actividad IECA con valores de IC_{50} de 2,4 y 27,9 μ M, respectivamente, y que además poseen actividad antihipertensiva,. Además, los resultados de este trabajo muestran la importancia de la digestión en la formación de nuevos péptidos inhibidores de la ECA. Tras la simulación de la digestión, la actividad IECA fue similar o ligeramente inferior que la de los péptidos sin hidrolizar. Sin embargo, se pudo observar un aumento importante de la actividad del péptido DKIHPP, fragmento 47-52 de la β -caseína, después de la digestión que podría deberse a la liberación del fragmento DKIHP.

2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA EN LECHE FERMENTADAS CON *Enterococcus faecalis*

En el marco de un proyecto conjunto entre el grupo Leches Pascual, el Instituto de Farmacología y Toxicología del CSIC y el Instituto de Fermentaciones del CSIC, cuyo objetivo era producir una leche fermentada con actividad antihipertensiva cuyos péptidos responsables de esta actividad fueran distintos a los descritos hasta el momento, se aislaron 231 cepas de distintos microorganismos a partir de leche cruda y se calculó la actividad IECA de las leches fermentadas producidas los mismos. De los 231 microorganismos se seleccionaron 46 cuyas leches fermentadas diluidas al 50% en agua presentaban una actividad IECA mayor del 70%, y sus correspondientes bacterias fueron identificadas. Cuatro cepas de *Enterococcus faecalis* eran capaces de producir leches fermentadas con una potente actividad IECA y antihipertensiva en SHR (Muguerza y col., 2006).

En este capítulo se ha evaluado en profundidad la actividad IECA de estas leches y se han identificado los péptidos responsables de su actividad antihipertensiva. El aislamiento de los péptidos se ha realizado mediante dos etapas de cromatografía y posteriormente se han secuenciado por espectrometría de MS/MS. Además, se ha desarrollado un método mediante RP-HPLC-MS/MS que permite la cuantificación de péptidos bioactivos en mezclas complejas. Así, se ha podido realizar un estudio sobre la producción de un péptido con actividad IECA y antihipertensiva durante la fermentación con *E. faecalis*. También se han realizado estudios enzimáticos y de biodisponibilidad de los péptidos de interés.

2.1. Actividad IECA de las leches fermentadas

Se evaluó la actividad IECA expresada como IC_{50} (concentración necesaria de proteína en $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el 50% de actuación de la ECA), el pH y la presencia o ausencia de los péptidos IPP y VPP, en el extracto soluble en agua de las leches fermentadas con cepas de *E. faecalis*. En la **Tabla 9** se recogen los valores de pH y de

IC₅₀ del extracto soluble en agua de las leches fermentadas. Los valores de pH de las muestras son similares entre ellos y se encuentran dentro de los valores normales que presentan este tipo de leches fermentadas. Los valores de IC₅₀ estuvieron comprendidos entre 34 y 59.6 µg/mL y son indicativos de una alta actividad IECA. Esta actividad es aproximadamente 6 veces mayor que la encontrada para el kefir y del orden de la encontrada en un hidrolizado de clara de huevo con pepsina (IC₅₀ de 55,3 µg/mL), que mostró actividad antihipertensiva en SHR en un estudio agudo y crónico (Miguel y col., 2004; 2005a; 2005b). Las leches fermentadas con *E. faecalis* mostraron un claro efecto antihipertensivo cuando se administraron oralmente a través de una sonda intragástrica a SHR. El efecto de todas las leches fue similar y la máxima disminución en la presión arterial sistólica y en la presión arterial diastólica se observó siempre a las 4 horas después de la administración (Muguerza y col., 2006).

Tabla 9. Valores de pH y de IC₅₀ de las leches fermentadas con distintas cepas de *E. faecalis*.

MICROORGANISMO	pH	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Enterococcus faecalis</i> (CECT 5727)	4.51	39
<i>Enterococcus faecalis</i> (CECT 5728)	4.50	59.6
<i>Enterococcus faecalis</i> (CECT 5826)	4.55	49
<i>Enterococcus faecalis</i> (CECT 5827)	4.52	34

Una vez evaluada la capacidad IECA de las leches fermentadas, se realizó un estudio para determinar si esta alta actividad era debida a la presencia de los péptidos IPP y VPP. Estos dos péptidos fueron descritos por Nakamura y col. (1995) como potentes inhibidores de la ECA, con valores de IC₅₀ de 5 µM para el VPP y 9 µM para el IPP, y a ellos se debe la actividad antihipertensiva que poseen las leches fermentadas Calpis[®] y Evolus[®], comercializadas en Japón y Finlandia respectivamente como alimentos funcionales con efecto hipotensor.

Se sintetizaron los péptidos IPP y VPP, y se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS (según se describe en el apartado 6) en las mismas condiciones que el extracto soluble en agua de las leches fermentadas con *E. faecalis*. Mediante la extracción de los iones

con m/z 312,1 correspondiente al péptido VPP y con m/z 326,2 correspondiente al IPP, en el extracto soluble en agua de las leches, se pudo determinar que ninguna de las dos secuencias se encontraban presentes y que por lo tanto la potente actividad IECA que se observaba en estas leches no se debía estos tripéptidos. Una vez confirmada la ausencia de IPP y VPP, el objetivo era identificar los péptidos que pudieran ser responsables de la actividad IECA de las leches fermentadas. Para llevar a cabo la identificación de los péptidos se eligió la leche fermentada con la cepa CECT 5727 de *E. faecalis* durante 24 horas.

2.2. Identificación y caracterización de los péptidos con actividad IECA

Ultrafiltración

Con el objetivo de localizar los péptidos con actividad IECA en el extracto soluble en agua de la leche fermentada, este extracto se sometió a un proceso de ultrafiltración a través de una membrana hidrofílica de 3.000 Da de tamaño de corte y se midió la actividad IECA de las diferentes fracciones. Como se observa en la **Figura 11**, la actividad del permeado de 3000 Da (IC_{50} 28 ± 2 $\mu\text{g/ml}$) fue casi dos veces mayor que la encontrada para el extracto soluble en agua total (IC_{50} 53 ± 2 $\mu\text{g/ml}$) y casi tres veces superior que la actividad de la fracción del retenido (IC_{50} 72 ± 7 $\mu\text{g/ml}$). Estos datos ponen de manifiesto la considerable contribución de los péptidos de pequeño tamaño a la actividad IECA del extracto soluble en agua obtenido a partir de la leche fermentada.

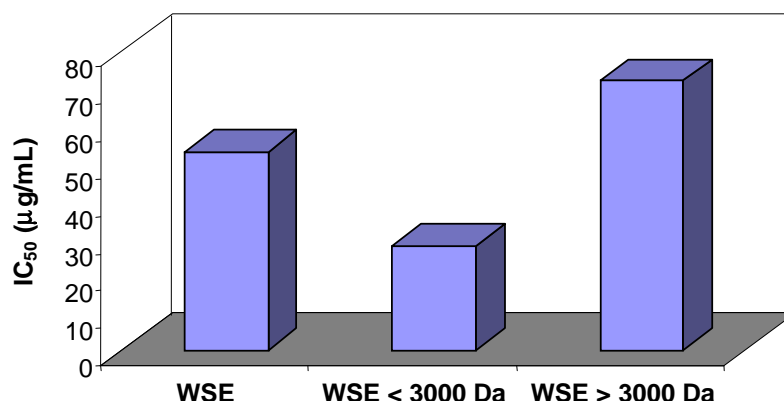


Figura 11. Actividad IECA del extracto soluble en agua total (WSE) y de las fracciones del extracto mayor (WSE > 3000 Da) y menor de 3000 Da (WSE < 3000 Da) de la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727. La actividad viene expresada como IC₅₀ (concentración necesaria de proteína en µg/ml para inhibir el 50% de la actividad de la enzima).

Aislamiento de los péptidos con actividad IECA por RP-HPLC semipreparativo

La fracción menor de 3000 Da obtenida en el proceso de ultrafiltración se analizó en el equipo de RP-HPLC a escala semipreparativa en las condiciones que se describen en el apartado 5 de materiales y métodos. El cromatograma obtenido en 65 minutos se dividió en 10 fracciones, las cuales se recogieron por separado varias veces y una vez eliminado el acetonitrilo, se congelaron y liofilizaron. Posteriormente se determinó la actividad IECA de las fracciones (**Figuras 12A y 12B**). La mayor parte de la actividad IECA del permeado de 3000 Da se concentraba en las fracciones 9 y 10, por lo que estas fracciones se sometieron a un segundo paso de purificación mediante RP-HPLC semipreparativo. Las **Figuras 12C y 12D** muestran el cromatograma obtenido para las fracciones 9 y 10 y los valores de IC₅₀ de las subfracciones recogidas. Como se puede ver en la **Figura 12D**, cuatro de las subfracciones: F9.1, F9.2, F10.2 y F10.3, fueron muy activas y mostraron valores de IC₅₀ menores a 6 µg/ml, especialmente la fracción F9.2 presentó una potente actividad IECA con un valor de IC₅₀ de $0,8 \pm 0,1$ µg/ml.

Identificación de los péptidos por RP-HPLC-MS/MS

Todas las subfracciones (F9.1, F9.2; F9.3, F10.1, F10.2, F10.3 y F10.4, Figura 7C) se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS y espectrometría de MS/MS en el equipo con fuente de ionización de ESI y con un analizador de trampa de iones descrito en el apartado 6 de materiales y métodos. La mayoría de fracciones cromatográficas presentaron una mezcla compleja de péptidos, que hacía imposible su secuenciación por procedimientos tales como la degradación de Edman. Existen distintas estrategias para la identificación por espectrometría de masas de péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas cuya secuencia es conocida. En nuestro caso, el método que se eligió consistió en la medida de las masas de los péptidos de cada fracción, búsqueda de las secuencias de aminoácidos cuya masa correspondiese a la masa observada experimentalmente y secuenciación del péptido utilizando la trampa iónica que permite la fragmentación de un ión precursor. El espectro de MS/MS así obtenido corresponde de forma inequívoca a una secuencia del grupo de péptidos seleccionados con la misma masa procedentes de distintas proteínas.

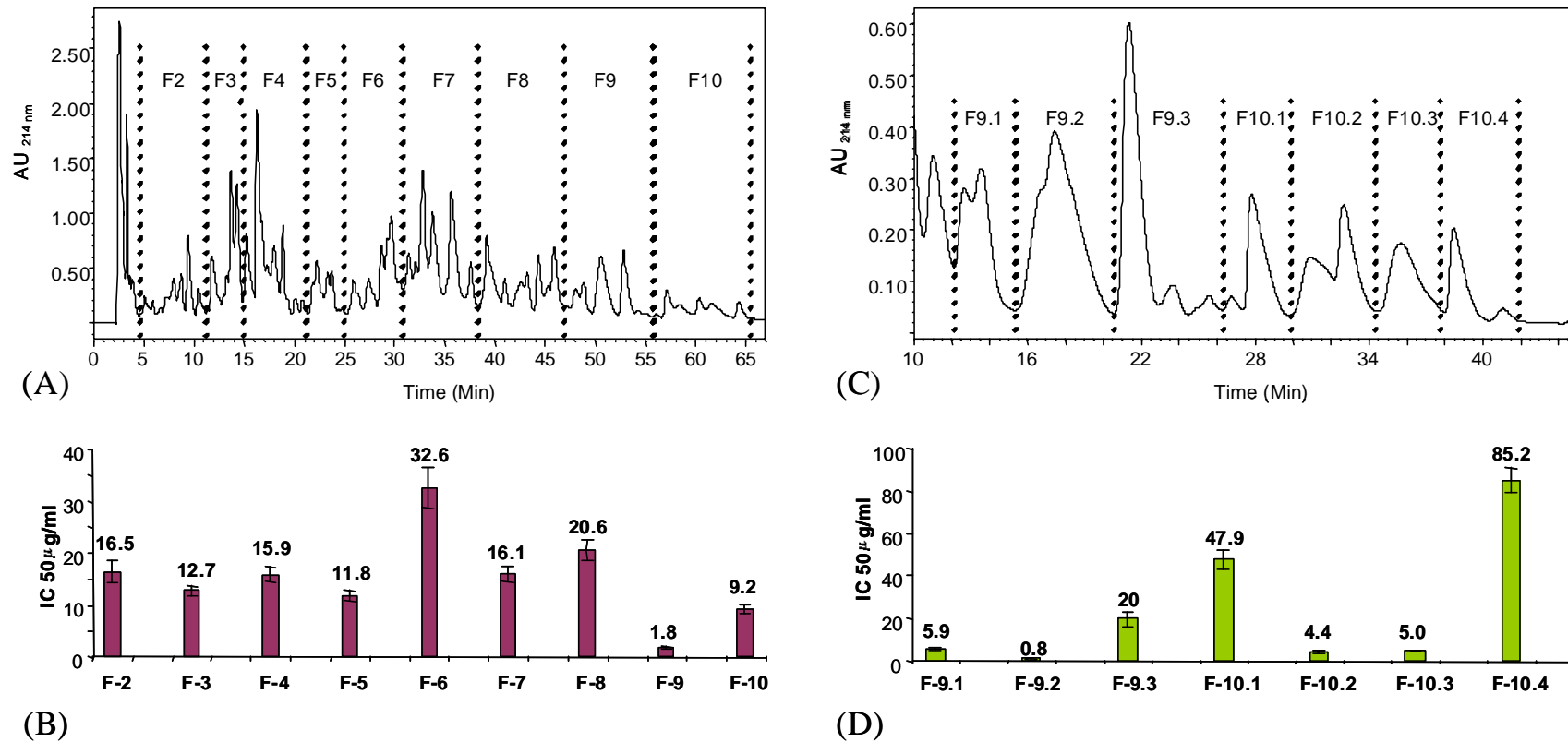


Figura 12. (A) Fraccionamiento del extracto soluble en agua menor de 3000 Da de la leche fermentada con *Enterococcus faecalis* CECT 5727 mediante RP-HPLC a escala semipreparativa (Las condiciones experimentales se describen en el apartado x). Se recogieron 10 fracciones que se encuentran nombradas con la letra F seguida del número correspondiente (F1-F10). (B) Actividad IECA, expresada como IC₅₀, de las fracciones recogidas mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. (C) Segundo fraccionamiento por RP-HPLC a escala semipreparativa de las fracciones F9 y F10 (las fracciones están designadas con el nombre de la fracción de la que proceden seguidas de un número), y (D) Actividad IECA correspondiente a estas fracciones. Para la determinación del IC₅₀, el contenido de proteína de las fracciones se determinó mediante el método del ácido bicinónico. Los datos se encuentran expresados como el valor principal ± SEM de un mínimo de tres medidas.

A modo de ejemplo la **Figura 13A** muestra el espectro de MS de la subfracción F 9.1, donde tras un proceso de deconvolución se obtuvieron los diferentes estados de carga de varios péptidos que permitieron determinar la masa molecular de los mismos. La **Figura 13B** muestra el espectro de MS/MS del ión doblemente cargado de relación m/z 520.0 correspondiente al compuesto A (**Figura 13A**). Este espectro se asignó al fragmento 197-206 de la β -caseína. La presencia de Pro en los péptidos se asocia a iones tipo y y b muy abundantes resultantes de la fragmentación del enlace peptídico N-terminal adyacente a Pro (Papayannopoulos, 1995), sin embargo dependiendo de la identidad del residuo que está unido a Pro la ruptura del enlace se ve más o menos favorecida. Así, en este espectro los iones b_3 e y_7 que se forman como consecuencia de la ruptura del enlace N-terminal a Pro presentan muy poca intensidad, debido a que la ruptura del enlace entre la Gly y la Pro no se ve favorecida probablemente por la conformación que presentan ambos aminoácidos (Breci y col, 2003).

Siguiendo esta estrategia se identificaron los péptidos mayoritarios de cada una de las subfracciones. En la **Tabla 10** se muestran los péptidos identificados, el fragmento de proteína de la que derivan, así como sus masas experimentales y teóricas. También se muestra el ión precursor m/z que se empleó en el proceso de fragmentación, y que sirvió para llevar a cabo la identificación del péptido. Se identificaron un total de 8 péptidos todos ellos correspondientes a fragmentos de la β -caseína, que además de ser la proteína láctea más abundante presenta una estructura poco ordenada que facilita su hidrólisis enzimática. Todas las secuencias identificadas son de pequeño tamaño, con pesos moleculares inferiores a 2100 Da, presentan un marcado carácter hidrofóbico y son ricas en el aminoácido Pro.

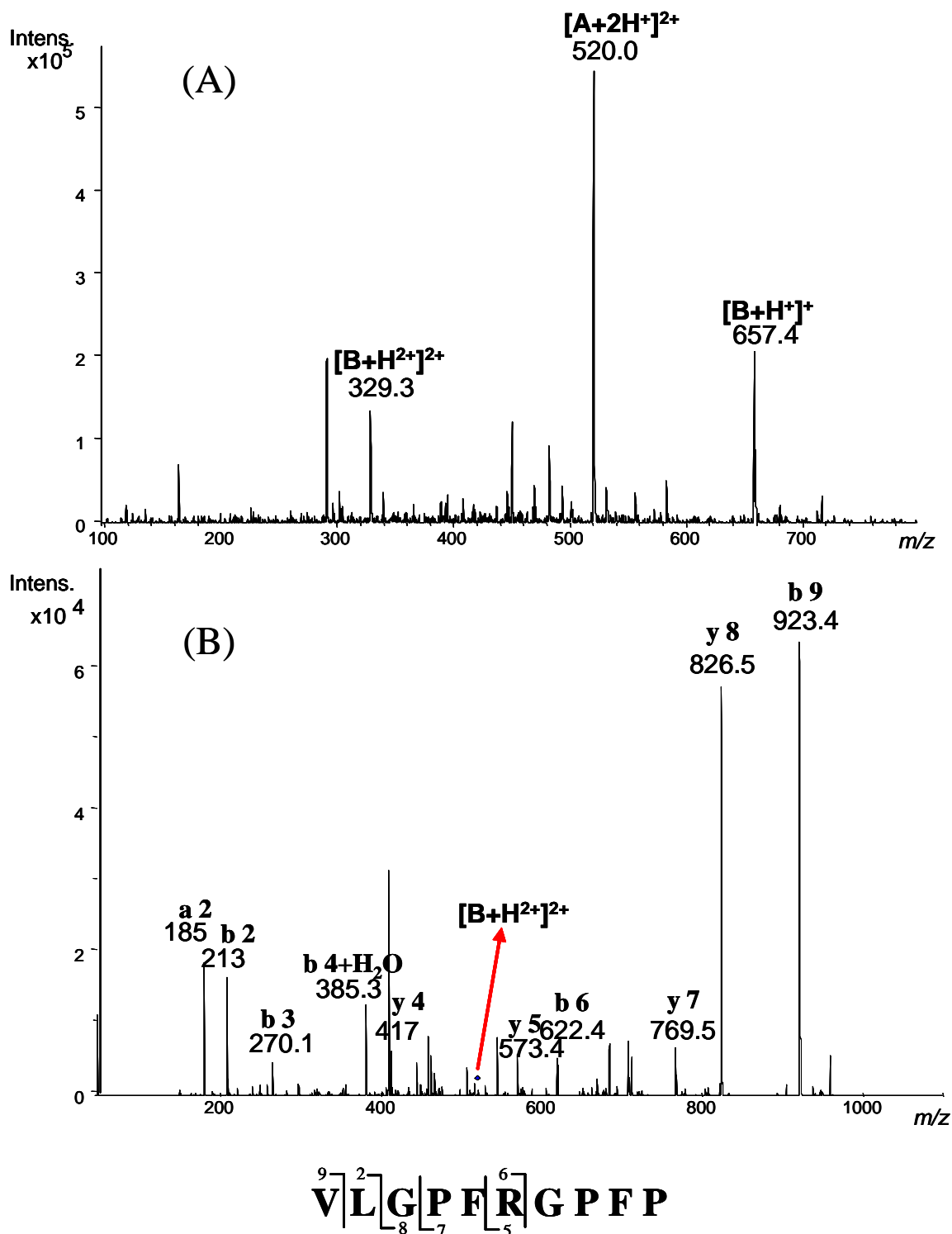


Figura 13. (A) Espectro de masas de la subfracción 9.1. (B) Espectro de MS/MS del ión doblemente cargado m/z 520,0. La interpretación del espectro de MS/MS y la búsqueda en la base de datos permitió asignar este espectro al fragmento β -caseína (197-206), VLGPF₈R₅GPF₆PFP. Los fragmentos se designaron según la nomenclatura de Roepstorff y Fohlman (1984).

Tabla 10. Identificación de los péptidos incluidos en las fracciones con actividad IECA recogidas mediante RP-HPLC a escala semipreparativa y actividad IECA expresada como IC₅₀ (concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima) de los péptidos sintéticos.

Fracción ^a	Masa experimental	Masa teórica ^b	Ión precursor (<i>m/z</i>) en MS/MS (carga)	Fragmento	Secuencia
F9.1	1037.6	1037.60	520.0 (2)	β-CN f(197-206)	VLGPVRGPFPP
	656.3	656.39	329.3 (2) 657.3 (1)	β-CN f(82-87)	VVPPF
F9.2	688.4	688.42	345.4 (2)	β-CN f(133-138)	LHLPLP
			689.4 (1)		
F9.3	1196.6	1196.68	1197.4 (1)	β-CN f(77-87)	LTQTPVVVPPF
F10.1	996.6	996.61	499.5 (2)	β-CN f(201-209)	VRGPFPIIV
			997.7 (1)		
F10.2	801.5	801.51	401.9 (2)	β-CN f(133-139)	LHLPLPL
F10.3	2059.4	2059.11	2060.0(1)	β-CN f(58-76)	LVYFPFGPIPNLSLPQNIPP
F10.4	1362.7	1362.84	682.7 (2)	β-CN f(197-209)	VLGPVRGPFPIIV
			1363.7 (1)		

^a Numeración de las subfracciones como se indica en la **Figura 10**

^b Masa media

^c Nomenclatura de una letra para cada aminoácido.

Una vez identificados los péptidos de las fracciones más activas procedentes del extracto soluble en agua de la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 se determinó la presencia de los mismos en las leches fermentadas con otras cepas de *E. faecalis*. Para ello se analizaron los extractos solubles en agua de las muestras por RP-HPLC-MS/MS, y se llevó a cabo la extracción de los iones característicos de cada péptido. Todos los péptidos identificados en la **Tabla 10** se detectaron también en el extracto soluble en agua procedente de las leches fermentadas con *E. faecalis* CECT 5728, CECT 5826 y CECT 5827. Estos resultados muestran la importancia de la selectividad de la actividad enzimática de *E. faecalis* empleada para la producción de péptidos con actividad IECA.

Actividad IECA de los péptidos identificados

Los 8 péptidos identificados por RP-HPLC-MS/MS se sintetizaron químicamente y se determinó su IC_{50} (**Tabla 11**). Las secuencias identificadas en las fracciones F9.2 y F10.3 fueron las que presentaron un IC_{50} menor. Concretamente, los péptidos correspondientes a la β -caseína (133-138), LHLPLP, y β -caseína (58-76), LVYFPFGPIPNSLPQNIPP, presentaron valores de IC_{50} de 5,4 y 5,3 μ M respectivamente. Sorprendentemente, el péptido identificado en la subfracción F10.2 presentó un IC_{50} mayor que el que se podía esperar teniendo en cuenta la actividad encontrada en la subfracción. Probablemente existan otros péptidos minoritarios con actividad IECA que no han sido identificados y contribuyen a la actividad total de la subfracción. El mismo efecto había sido observado previamente por Gobbetti y col., 2000, cuando analizaron la actividad IECA de varios péptidos sintéticos identificados en muestras de leches fermentadas. Como en nuestro caso, los valores de IC_{50} de los péptidos puros fueron considerablemente mayores que los encontrados para las fracciones de HPLC. Estos autores establecieron la hipótesis de que el efecto inhibitorio de las mezclas de péptidos es mucho mayor que el de los péptidos por separado.

Tabla 11. Actividad IECA expresada como IC₅₀ (μM) de los péptidos sintéticos.

Péptido sintético ^a	IC₅₀ (μM)
VLGPVRGPFPP	137±6
VVVPPF	>1500
LHLPLP	5.5±0.4
LTQTPVVVPPF	>1500
VRGPFPIIV	599±55
LHLPLPL	425±44
LVYPPFGPIPNLQNIIP	5.2±0.3
VLGPVRGPFPIIV	>700

^a Nomenclatura de una letra para cada aminoácido.

Se sabe que durante la fermentación con bacterias ácido lácticas se puede generar un gran número de péptidos y que algunos de estos pueden tener potenciales propiedades bioactivas. Sin embargo, no todas las fermentaciones lácteas dan como resultado la producción de péptidos antihipertensivos. Algunos autores señalan que la fermentación láctea con cultivos iniciadores comerciales no puede producir péptidos con actividad IECA, pero que estos productos pueden ser precursores de péptidos con actividad tras la digestión de los mismos con enzimas gastrointestinales (Pihlanto-Leppälä y col., 1998). En un estudio llevado a cabo por Hernández-Ledesma y col., (2004) con leches fermentadas comerciales observaron que la mayoría de leches estudiadas poseían una moderada actividad IECA.

Para producir péptidos con actividad antihipertensiva es necesaria la utilización de un cultivo iniciador con una gran capacidad proteolítica. Hasta el momento, los péptidos con mayor actividad antihipertensiva se han obtenido con diferentes cepas de *Lactobacillus helveticus* (Fuglsang, Nilsson y Nyborg., 2002; Leclerc y col., 2002; Nakamura y col., 1995a, Robert y col., 2004; Sipola y col., 2001; Yamamoto, Maeno y

Takano, 1999). De hecho, dos de los péptidos antihipertensivos más potentes procedentes de proteínas alimentarias, los tripéptidos IPP y VPP, fueron identificados en una leche fermentada con *Lb. helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos péptidos presentaron valores de actividad IECA expresados como IC₅₀ de 5 y 9 µM respectivamente (Nakamura y col., 1995a). Cabe destacar que los dos péptidos identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 cuyas secuencias son LHLPLP y LVYFPGPPIPNSLPQNIPP presentan valores de IC₅₀ del orden de 5 µM y ambos exhiben una potente actividad antihipertensiva en SHR (Quirós y col., 2007).

Otros péptidos identificados en leches fermentadas han presentado actividad IECA con valores de IC₅₀ muy bajos, sin embargo su efecto antihipertensivo aún no se ha demostrado en animales de experimentación. Este es el caso de varios péptidos identificados en una leche fermentada con *Lb. helveticus* NCC 2765 que presentaron valores de IC₅₀ entre 15 y 650 µM (Robert y col., 2004). Tampoco se comprobado el efecto *in vivo* de varios de péptidos con actividad IECA derivados de caseína que han sido purificados en una leche fermentada con *Lb. delbrueckii* y *Lactococcus lactis* (Gobbeti y col., 2000), ni de los péptidos procedentes de hidrolizados de caseína obtenidos con una proteasa aislada procedente de *Lb. helveticus* PR4 (Minervini y col., 2003). Por otro lado, en otros estudios se ha comprobado la actividad antihipertensiva de los productos fermentados pero no se han identificado los péptidos responsables de dicha actividad. Por ejemplo, se han empleado varias cepas de *Lb. helveticus* para preparar leches fermentadas con propiedades antihipertensivas y otros efectos cardiovasculares (Fulgsang y col., 2002; Leclerc y col., 2002).

Se han identificado los péptidos responsables de la actividad IECA y antihipertensiva de las leches fermentadas con *E. faecalis*. Todos los péptidos identificados proceden de la β-caseína y tienen carácter hidrofóbico. Especialmente, todos ellos son ricos en el aminoácido Pro, que en posición C-terminal es uno de los residuos más favorables para la unión del péptido con el sitio activo de la enzima. Se sabe que la ECA muestra una gran especificidad con respecto al tripéptido C-terminal de los sustratos e inhibidores (Cushman y col., 1973). Uno de los péptidos identificados en este estudio, LHLPLP, presenta Pro en su extremo C-terminal y en antepenúltima

posición y este residuo en ambas posiciones favorece la unión con la enzima (Cushman y col., 1980). Se cree que el anillo rígido que contiene en su estructura el aminoácido Pro podría orientar al grupo carboxilo en una posición favorable para que se produzca la interacción con el residuo de carga positiva que presenta el sitio activo de la enzima (Cushman y col., 1977). No es de extrañar que el péptido LHLPLP, que contiene Leu en la última posición y Pro en penúltima posición, posea un IC_{50} 100 veces mayor que el LHLPLP, ya que se ha descrito que el aminoácido Pro en esta posición disminuye la afinidad de los péptidos por la ECA (Cheung y col., 1980). Cabe destacar, que es la primera vez que se demuestra la producción mediante fermentación del péptido LHLPLP, aunque esta secuencia se encontraba incluida en un screening de fragmentos sintéticos procedentes de la β -caseína humana en los que se determinó la actividad IECA (Kohmura y col., 1989). Además, se ha demostrado que el péptido LHLPLP presenta una potente actividad antihipertensiva en SHR, similar a la que poseen los péptidos inhibidores de la ECA IPP y VPP, que se encuentran en productos comercializados (Calpis[®] y Evolus[®]) con propiedades antihipertensivas (Quirós y col., 2006)

El otro péptido identificado con una elevada actividad IECA ($IC_{50} = 5,3 \mu M$) corresponde al fragmento de 19 aminoácidos 58-76 derivado de la β -caseína. Esta secuencia también fue identificada por Minervini y col., (2003) en un hidrolizado de caseína bovina producido con una proteinasa parcialmente purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4. La presencia del tripéptido IPP en el extremo C-terminal justifica el IC_{50} tan bajo hallado para este péptido. Sin embargo, la actividad antihipertensiva de este péptido en SHR fue menor que la encontrada para el péptido LHLPLP (Quirós y col., 2006).

De esta parte del trabajo se puede concluir que las leche fermentadas con distintas cepas de *E. faecalis* contienen péptidos con actividad IECA y antihipertensiva. Las secuencias responsables de esta actividad son péptidos de bajo peso molecular y ricos en el aminoácido Pro. De especial interés es el fragmento 133-138 de la β -caseína, LHLPLP, que posee una potente actividad IECA con un IC_{50} de $5,5 \mu M$ y además presenta actividad antihipertensiva *in vivo*. Cabe destacar que la actividad IECA y

antihipertensiva de este péptido es comparable con la encontrada en péptidos inhibidores de la ECA antihipertensivos que se encuentran incluidos en alimentos funcionales comercializados.

2.3. Análisis cuantitativo del péptido LHLPLP

En esta parte del trabajo se describe el método analítico para poder determinar la cantidad del péptido antihipertensivo LHLPLP en leches fermentadas, con el mínimo tratamiento o prefraccionamiento de la muestra. Se evaluó la utilización de RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS para cuantificar este péptido bioactivo, y el método fue validado determinando la repetitividad, reproducibilidad, linealidad y recuperación. Finalmente el método se aplicó a distintos productos fermentados obtenidos mediante la utilización de *E. faecalis* y diferentes condiciones de fermentación.

Selección de las condiciones de análisis

Para el desarrollo del método cuantitativo por RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS se empleó el equipo descrito en el apartado 6 de materiales y métodos. Las condiciones de análisis del péptido LHLPLP se optimizaron con el extracto soluble en agua de una leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5728 durante 24 horas. El cromatograma obtenido de esta forma presentó un perfil muy complejo (**Figura 14A**), donde el péptido de interés, LHLPLP, eluía junto con otros péptidos entre los minutos 44,3 y 47,3. La señal del espectrómetro de masas en esta zona del cromatograma (corriente total de iones) mostraba también la presencia de una mezcla compleja de varios péptidos (**Figura 14B**). Las modificaciones en el gradiente de HPLC no lograron mejorar la resolución del pico cromatográfico del péptido. Finalmente, todas las muestras se eluyeron con un gradiente lineal del 0% al 45% del disolvente B en A en 60 minutos, con un flujo de 0,8 $\mu\text{l}/\text{ml}$ y el volumen de inyección de la muestra fue 50 μl . Los espectros se adquirieron en un rango de masas de 100 a 1000 m/z , con los parámetros de voltaje optimizados para el ión con m/z 689,4 correspondiente al péptido LHLPLP. El espectro de masas obtenido entre los minutos 44,3 y 44,7 mostraba que el péptido de

interés coelúa con otras secuencias con valores de m/z de 962,2 y 838,4. En este espectro también se observaban los aductos de sodio y de potasio con m/z 711,4 y 727,4 correspondientes al LHLPLP (**Figura 15A**).

Con extracción del ión molecular correspondiente al péptido LHLPLP (ión con m/z 689,4; **Figura 14C**) se obtuvo un único pico de gran intensidad con un tiempo de retención en el minuto 45,8, mejorándose de esta manera la especificidad. Aunque la selectividad y la intensidad de la señal de la extracción del ión m/z 689,4 permitía el desarrollo de la determinación cuantitativa del péptido, se evaluó también la respuesta del péptido en el análisis de espectrometría MS/MS. Para este propósito se optimizaron las condiciones de fragmentación mediante la infusión directa a un flujo de 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ del péptido sintético (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en una solución de acetonitrilo: agua (50: 50) con 0,3% de ácido fórmico. Como era de esperar, debido a la presencia de las dos Pro en la secuencia LHLPLP se obtuvieron dos fragmentos de gran intensidad con valores de m/z 364,2 y 574,3, que se identificaron como iones tipo b adyacentes a Pro, en concreto, b_3 y b_5 , respectivamente (Papayannopoulos, 1995; **Figura 15B**). Además, esta ruptura se encuentra especialmente favorecida cuando el residuo que se encuentra en el extremo N-terminal de la prolina es leucina (Breci y col., 2003). La presencia de una histidina en la segunda posición empezando por el extremo N-terminal explica una mayor abundancia de iones tipo b con respecto a los tipo y , con excepción del ión y_4 , que corresponde a una ruptura que se encuentra favorecida. La extracción de los iones principales que se forman en la fragmentación (m/z 574,3; 439,2; 364,2 y 251,0) daba lugar a dos picos (**Figura 14D**), uno correspondiente al péptido LHLPLP y el otro fue identificado por espectrometría de MS/MS como el péptido LHLPLPL, el cual al fragmentarse da lugar a una serie de iones comunes con los de la secuencia LHLPLP.

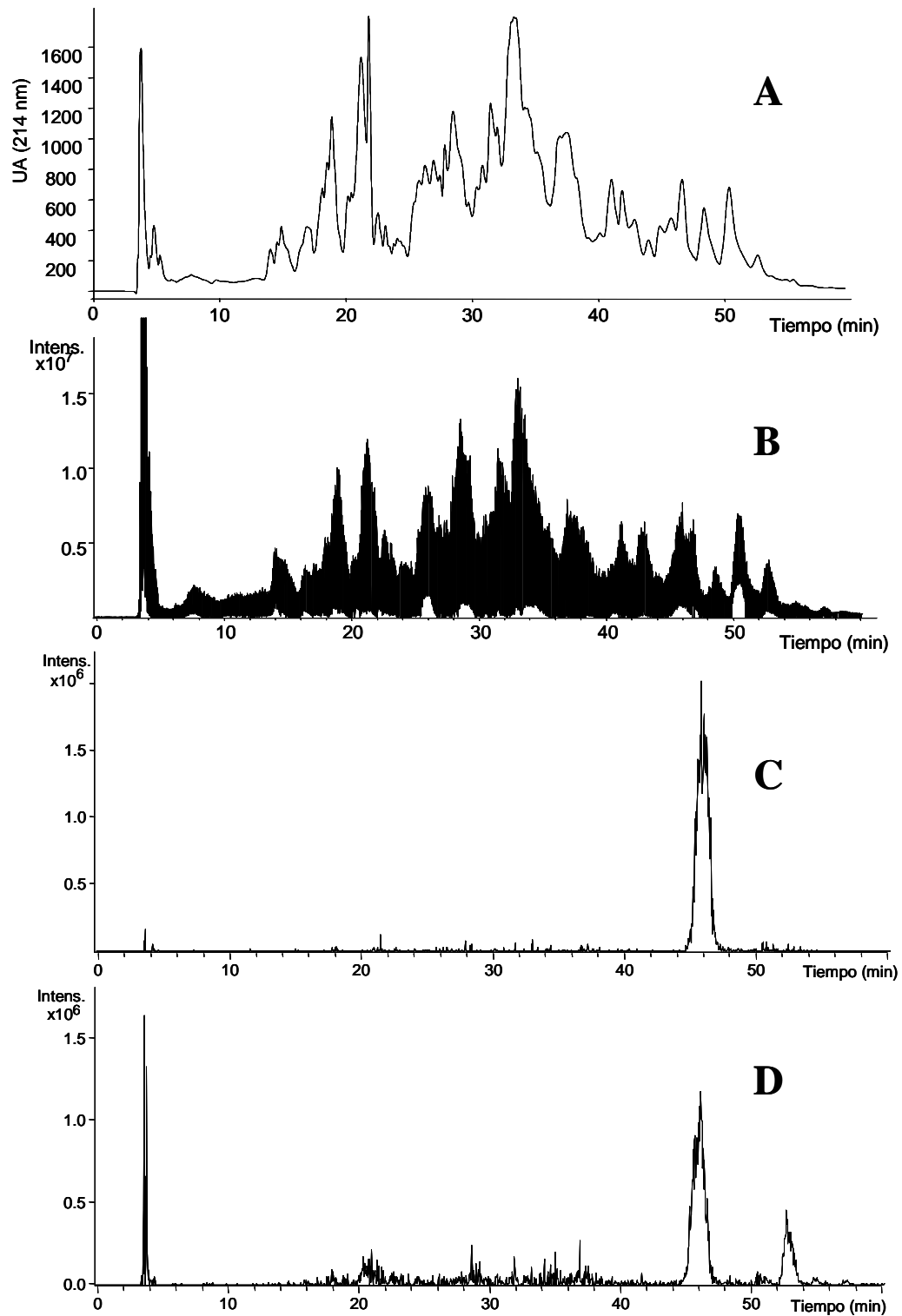


Figura 14. (A) Análisis mediante RP-HPLC con detector de ultravioleta a 214 nm del extracto soluble en agua de la leche fermentada con *Enterococcus faecalis* CECT 5728 (B) Corriente total de iones (C) Extracción del ión molecular correspondiente al péptido LHLPLP con m/z 689,4. (D) Extracción de los iones que se forman durante la fragmentación del péptido LHLPLP con m/z 574,3; 439,2; 364,2; y 251,0.

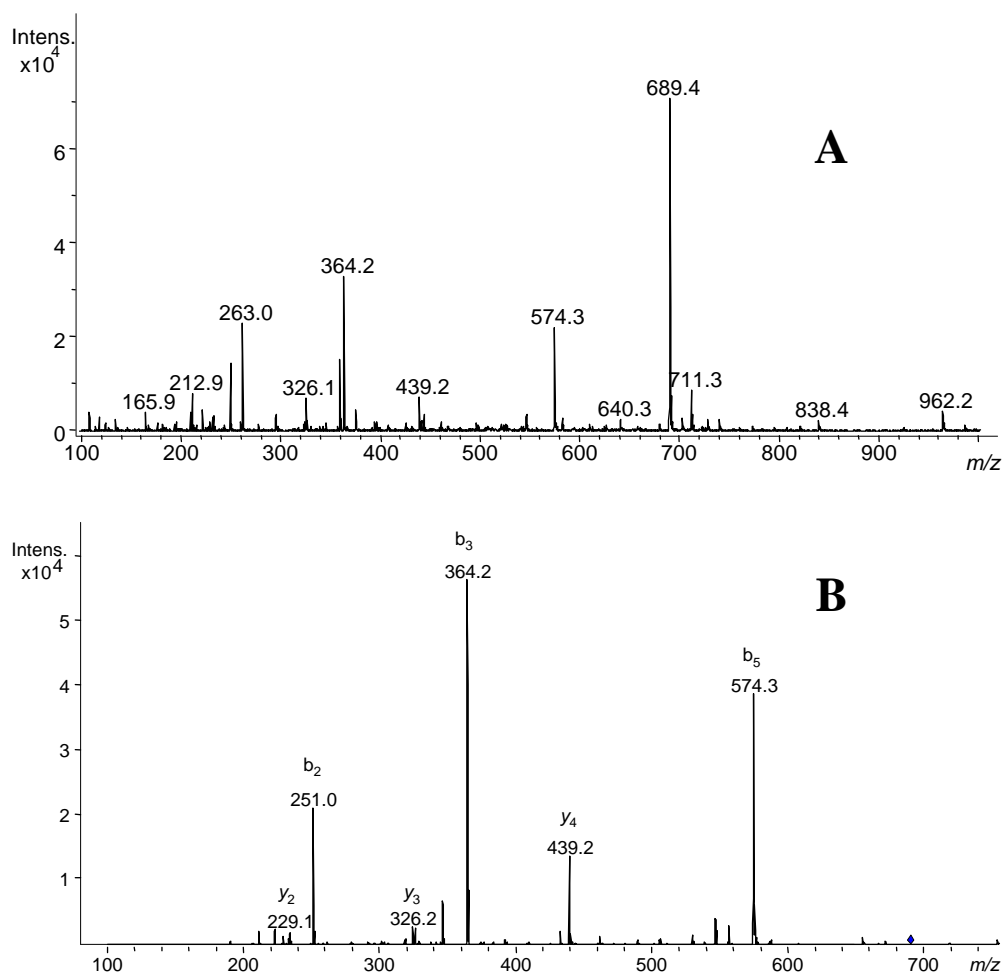


Figura 15. (A) Espectro de masas de los péptidos que eluyen en el cromatograma de RP-HPLC entre los minutos 44,3 y 47,3. (B) Espectro de MS/MS del ión m/z 689,4. Los fragmentos se designaron según la nomenclatura de Roepstorff y Fohlman (1984).

Validación del Método

Repetibilidad y Reproducibilidad

La repetibilidad se calculó mediante la desviación estándar relativa (RSD) del área del pico correspondiente al péptido de 6 análisis consecutivos del extracto soluble en agua de la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5728. Los valores obtenidos para este parámetro se muestran en la **Tabla 12** y se encuentran entre 2,6 y 3,9%,

dependiendo de los iones empleados en el análisis, mediante RP-HPLC-MS con la extracción del ión con m/z 689,4 y sus aductos correspondientes, o mediante el análisis por RP-HPLC-MS/MS con la extracción de los distintos fragmentos.

La reproducibilidad se calculó mediante el RSD de las áreas del pico correspondiente al péptido de 10 análisis consecutivos de la leche fermentada realizados en dos días distintos (separados una semana). Los valores obtenidos para este parámetro se encuentran por debajo de 4% (**Tabla 12**). Estos valores son del orden de los hallados por otros autores en métodos de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización de electrospray y analizador de trampa de iones (Holstege y col., 2002; Araujo y Froyland, 2006).

Estos parámetros se calcularon también introduciendo como patrón interno el péptido sintético GHLPLP, pero la repetibilidad aumentó a 6,14% para los análisis de HPLC-MS y a 16,69% para los análisis por RP-HPLC-MS/MS utilizando los cuatro fragmento más intensos (m/z 251; 364,1; 439,2; 574,3), por lo que se descartó el uso de un patrón interno para llevar a cabo la cuantificación

Tabla 12. Repetibilidad calculada con la desviación estándar relativa del área del pico correspondiente al péptido LHLPLP tras la extracción de los iones que se indican en la primera columna de seis análisis consecutivos del extracto soluble en agua de la leche fermentada con *Enterococcus faecalis* CECT 5728. La reproducibilidad se calculó mediante la desviación estándar relativa de las áreas de diez análisis de la leche fermentada realizados en 2 días distintos separados entre sí una semana.

	Repetibilidad	Reproducibilidad
MS (m/z 689.4; 711.1;727; 733)	3.4 %	4.0%
MS/MS (m/z 364.1;574.3)	3.9 %	3.6 %
MS/MS (m/z 251; 364.1;574.3)	2.6 %	2.3 %
MS/MS (m/z 251; 364.1;439.2;574.3)	3.9 %	3.6 %

Linealidad

Se calcularon las regresiones lineales para los análisis de RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS del área del pico vs. concentración del péptido sintético disuelto en agua y en el extracto soluble en agua de una leche fermentada comercial, empleándose para ello los triplicados de 6 concentraciones distintas que se encuentran en el rango indicado en la **Tabla 13**. Para los análisis de espectrometría de MS/MS, se calcularon 3 curvas teniendo en cuenta 2, 3 o 4 fragmentos obtenidos a partir del ión molecular.

La falta de ajuste de los modelos lineales se calculó con el *F*-ratio (Massart y col., 1990), y cuando se obtuvieron resultados significativos se utilizó un polinomio de segundo grado. La **Figura 16** muestra las curvas de calibrado del área del pico vs. concentración del péptido para RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS utilizando los diferentes fragmentos. Los parámetros de las regresiones y estadísticos se encuentran recogidos en la **Tabla 13**. Todos los valores de la tabla son significativamente distintos de cero ($p < 0,05$). Como se puede ver en la tabla, para los análisis de RP-HPLC-MS/MS se obtuvieron ecuaciones lineales, mientras que para los análisis de RP-HPLC-MS los resultados corresponden a una ecuación de segundo grado. Los valores obtenidos para el coeficiente de determinación (R^2 en la **Tabla 13**) fueron superiores a 0,99, lo que indicó que el ajuste era aceptable, con una desviación de los residuos, expresada como porcentaje del valor principal de respuesta (CV) $\leq 6\%$ en todos los casos.

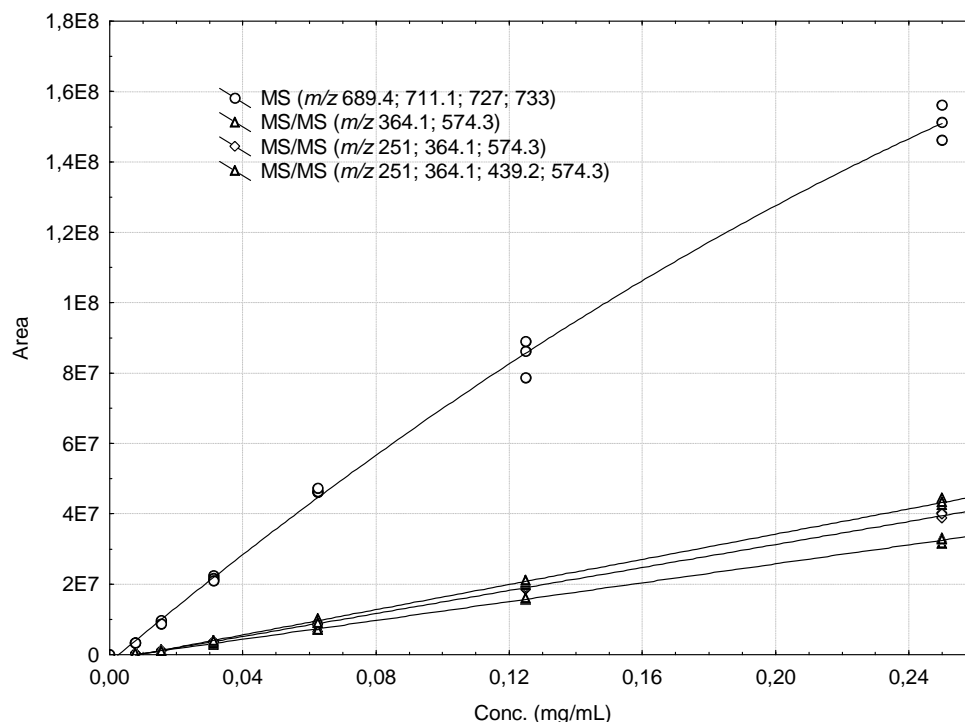


Figura 16. Curvas de calibrado para el péptido LHLPLP disuelto en agua obtenidas para los análisis por RP-HPLC-MS con la extracción del ion m/z 689,4 y sus correspondientes aductos y mediante el análisis por RP-HPLC-MS/MS y la extracción de los distintos fragmentos.

Los valores de recuperación se calcularon con la siguiente fórmula: $\text{recuperación} = \frac{[(Q_a - Q_b) \times 100]}{Q_c}$, donde Q_a es la cantidad en la muestra a la que se ha añadido el péptido a una concentración, Q_b es la cantidad inicial de péptido en la muestra y Q_c es la cantidad de péptido añadida a la muestra (Massart y col., 1990). Los valores principales del parámetro recuperación se calcularon a partir de los resultados obtenidos en los experimentos de recuperación en los que dos concentraciones del péptido LHLPLP (0,1 y 0,2 mg/ml) se añadieron al extracto soluble en agua de una leche fermentada con *E. faecalis*, inyectándose cada punto por triplicado. Se obtuvieron mejores resultados de recuperación cuando se usaron las curvas de calibrado obtenidas para el péptido sintético disuelto en agua que cuando se utilizaron las del péptido sintético disuelto en la leche fermentada comercial, por lo que las curvas del péptido disuelto en agua se emplearon en los siguientes análisis.

Se hallaron valores de recuperación comprendidos entre un 87% que se obtuvo para los análisis de RP-HPLC-MS, hasta un valor del 94% obtenido para los análisis por RP-HPLC-MS/MS utilizándose 3 iones de la fragmentación del péptido (**Tabla 13**). Para los análisis de RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS con 4 iones (m/z 251.0; 364,1; 439, 2; 574,3), los valores principales de recuperación fueron significativamente distintos de 100 ($p > 0,05$). Sin embargo, para los análisis por HPLC-MS/MS con 2 iones (m/z 364,1; 574,3) y 3 iones (m/z 251; 364,1 y 574,3) los valores principales de recuperación no fueron significativamente distintos de 100 ($p > 0,05$). Además, los valores RSD de las áreas se encontraban por debajo del 4%, por lo que cualquiera de estas dos regresiones lineales podían ser utilizadas para calcular la concentración de LHLPLP.

Límites de detección y cuantificación

La cuantificación de las muestras se llevó a cabo con la recta de calibración obtenida para los análisis de RP-HPLC-MS/MS con 3 iones (m/z 251; 364,1 y 574,3). Los límites de detección y cuantificación se calcularon como la concentración de péptido que daba una señal igual a la señal del ruido a la que se suma 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Miller y Miller, 2000). El valor que se obtuvo para el límite de detección fue de 7 $\mu\text{g/ml}$ y de 25 $\mu\text{g/ml}$ para el límite de cuantificación. Este límite de detección podría mejorarse fácilmente aumentando el flujo a la fuente de electro spray de 20 a 300 $\mu\text{l/min}$, el problema es que con flujos altos se puede ensuciar la fuente de electro spray en el espectrómetro de masas y debería limpiarse periódicamente para evitar una disminución en la respuesta.

Tabla 13. Regresión polinómica ($y = a + bx + cx^2$) para el área vs. concentración de las soluciones estándar del péptido LHLPLP en agua y en leche fermentada obtenidas mediante el análisis por RP-HPLC-MS y RP-HPLC-MS/MS.

	Concentración (mg/mL)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	R^2	<i>s</i>	CV (%)	P-valor	<i>n</i>	Recuperación (valor principal)
MS^A (M/Z 689.4; 711.1;727; 733)	0-0.25	-2.16584E6	7.93250E8	-7.22586E8	0.997	2.86970E6	5.7	0.08	18	86.95*
MS/MS ^A (<i>m/z</i> 364.1;574.3)	0-0.25	-1.04283E6	1.34205E8	-	0.999	0.34966E6	3.5	0.69	18	94.39
MS/MS ^A (<i>m/z</i> 251; 364.1;574.3)	0-0.25	-1.38708E6	1.63390E8	-	0.999	0.41551E6	3.5	0.19	18	92.26
MS/MS ^A (<i>m/z</i> 251; 364.1;439.2;574.3)	0-0.25	-1.55363E6	1.78949E8	-	0.998	0.56676E6	4.3	0.37	18	92.31*
MS^B (M/Z 689.4; 711.1;727; 733)	0-0.25	0.92202E6	9.40727E8	-1.00653E9	0.998	2.31252E6	4.2	0.27	18	72.31*
MS/MS ^B (<i>m/z</i> 364.1;574.3)	0-0.25	-0.20506E6	1.46935E8	-	0.997	0.65996E6	5.6	0.16	18	86.21*
MS/MS ^B (<i>m/z</i> 251; 364.1;574.3)	0-0.25	-0.28507E6	1.75608E8	-	0.998	0.64929E6	4.6	0.13	18	85.94*
MS/MS ^B (<i>m/z</i> 251; 364.1;439.2;574.3)	0-0.25	-0.06945E6	1.92306E8	-	0.996	0.96229E6	6.1	0.04	18	86.08*

A Solución estándar de LHLPLP en agua

B Solución estándar de LHLPLP en leche fermentada

R^2 , coeficiente de determinación; *s*, desviación estándar residual; CV(%) = (s/\bar{y})*100; desviación estándar residual expresada como porcentaje dle valor principal; P-valor, procede del test de la falta de ajuste para la regresión; *n*, número de puntos utilizados; Recuperación = (cantidad detectada en la muestra a la que se añade péptido estándar a una concentración-cantidad detectada en al muestra)·100/cantidad añadida.

* Significativamente distinto de 100 ($p < 0.05$).

Todos los coeficientes de regresión (*a*, *b*, *c*) son significativamente distintos de cero ($p < 0.05$)

Análisis de las leches fermentadas

Empleando la recta obtenida para el análisis por RP-HPLC-MS/MS con 3 iones (m/z 251; 364,1 y 574,3), se determinó la concentración del péptido LHLPLP en leches fermentadas con *E. faecalis* CECT 5727 y CECT 5728 a diferentes tiempos de fermentación (0, 3, 6, 9, 24, y 48 horas; **Figura 17**). Para describir la evolución de la concentración con el tiempo de fermentación se eligió el siguiente modelo matemático:

$$Y = A+(B-A)*(1-\exp(-K*t))$$

Donde Y representa la concentración del péptido (en mg/ml), t el tiempo, en horas, y A the Bottom, B the Top y K la constante de velocidad. Los resultados obtenidos con la regresión no lineal se muestran también en la **Figura 17**: los valores de los parámetros que mejor se ajustan, y también los valores que sirven para juzgar si el ajuste es adecuado (el coeficiente de determinación, R^2 , y la desviación estándar de los residuos, $S_{y,x}$).

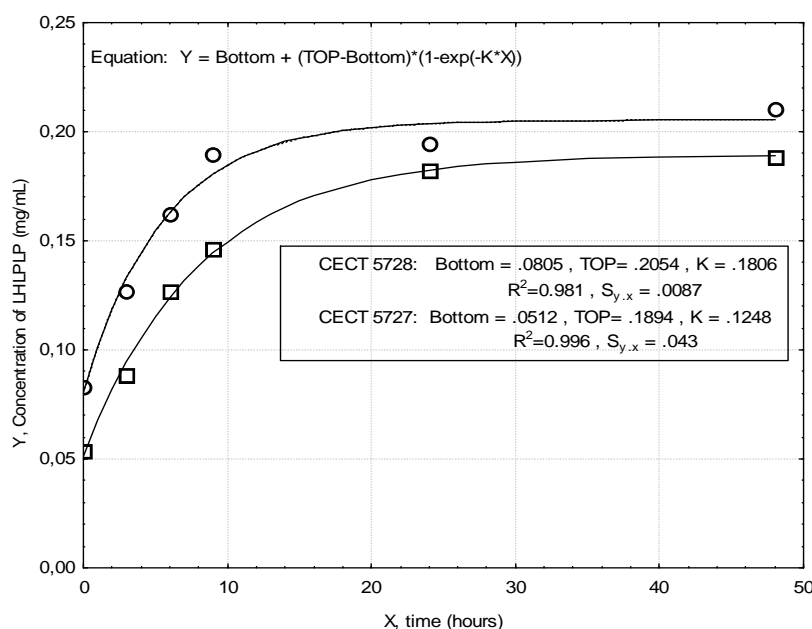


Figura 17. Concentración del péptido LHLPLP en las leches fermentadas con *E. faecalis* CECT 5727 y CECT 5728, a distintos tiempos de fermentación: 0, 3, 6, 9, 24 y 48 horas. Ecuación matemática elegida para describir la evolución de la concentración del péptido con el tiempo de fermentación.

Como se puede observar en la **Figura 17** la cantidad de LHLPLP fue mayor cuando se empleó para llevar a cabo la fermentación de la leche la cepa CECT 5728 de *E. faecalis* y en ambos casos, tanto cuando se utilizó la cepa CECT 5728 como cuando la fermentación se realizó con la cepa CECT 5727, la concentración de LHLPLP alcanzó un máximo después de 20 horas de fermentación.

De la misma forma que en caso anterior, se evaluó la concentración de péptido producida tras la fermentación con *E. faecalis* CECT 5728 de una leche enriquecida con caseína donde se había estandarizado el contenido en proteína (**Tabla 14**). Las cantidades del péptido LHLPLP fueron mayores con un contenido en proteína del 5,5% que con un contenido en proteína del 4,3 %. De nuevo, la concentración del péptido aumentó con el tiempo hasta las 24 horas de fermentación, por lo que no es necesario fermentar durante más tiempo para conseguir la máxima cantidad de péptido. El incremento de la actividad IECA en una leche fermentada enriquecida en caseína se había demostrado anteriormente por otros autores (Leclerc y col., 2002). Por lo tanto, podría ser interesante la adición de caseinato a la leche para aumentar la producción de péptidos bioactivos de interés durante la fermentación.

El método desarrollado también se empleó para llevar a cabo la cuantificación del péptido en diferentes mezclas realizadas con la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5728 durante 24 horas y distintas cantidades de un yogurt líquido comercial edulcorado y aromatizado que se utilizó para aumentar la palatabilidad del producto. Asimismo, se analizó una de las leches fermentadas enriquecida con Ca (2 gr/l). Estas muestras se prepararon en diferentes procesos de fermentación y se emplearon en un estudio crónico para evaluar el efecto antihipertensivo de estos productos en SHR (Miguel y col., 2005).

La leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5728 contenía 0,234 mg/ml de péptido, y después de la mezcla con el yogur líquido entre 0,138 mg/ml y 0,164 mg/ml, dependiendo del lote considerado. La presencia de Ca en la muestra no afectó a la cuantificación del péptido. Estos productos causaron un descenso significativo en la

presión arterial sistólica y diastólica de SHR, y este efecto fue mayor cuando se alimentó a las ratas con la leche enriquecida en Ca (Miguel y col., 2005).

Tabla 14. Cuantificación del péptido LHLPLP en el extracto soluble en agua de la leche estandarizada a distintas concentraciones de proteína durante la fermentación con *Enterococcus faecalis* CECT 5728.

Tiempo de Fermentación	% Proteína	LHLPLP (mg/ml) ^a
24 h	4,3	0,258
26 h	4,3	0,243
28 h	4,3	0,247
31 h	4,3	0,226
34 h	4,3	0,240
24 h	5,5	0,301
26 h	5,5	0,266
28 h	5,5	0,265
31 h	5,5	0,281
34 h	5,5	0,298

De lo expuesto en este capítulo se puede concluir que se ha desarrollado un método para cuantificar el péptido antihipertensivo LHLPLP por RP-HPLC-MS/MS en leches fermentadas. El uso de espectrometría masas y de espectrometría de MS/MS proporciona cromatogramas muy limpios para este péptido sin apenas interferencias de del resto de componentes de la leche fermentada. El método presenta una variabilidad con un desviación estándar relativa inferior al 4% y una linealidad buena en el rango necesario para la determinación directa de este péptido en leches fermentadas con *E. faecalis* (de 7 a 250 µg/mL). Los análisis se desarrollaron sin ningún tratamiento previo de la muestra y se aplicaron para llevar a cabo la optimización del proceso de fermentación y de diversos productos desarrollados a partir de las leches fermentadas con *E. faecalis*.

2.4. Biodisponibilidad

Hasta el momento la mayoría de los estudios sobre péptidos con actividad IECA se han centrado en la producción y el aislamiento de los mismos. Sin embargo, existe muy poca información sobre la biodisponibilidad de estos péptidos después de su administración oral. En esta parte del trabajo se han realizado una serie de ensayos *in vitro* que tratan de emular el proceso que tiene lugar en el organismo tras la ingestión de los péptidos. Es muy importante determinar la biodisponibilidad de los péptidos inhibidores de la ECA para garantizar su bioactividad, ya que para ejercer una reducción en la presión sanguínea es necesario que estos péptidos alcancen de forma activa los órganos diana en los que van a ejercer su función.

Se ha estudiado la susceptibilidad de los péptidos identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 a las enzimas gastrointestinales mediante un proceso de simulación gastrointestinal. El transporte transepitelial de uno de los péptidos se ha evaluado mediante el uso de células Caco-2, y también se han realizado ensayos para determinar la resistencia de los péptidos a las proteasas plasmáticas.

2.4.1. Simulación de la digestión gastrointestinal

Se ha evaluado el impacto de la digestión gastrointestinal en la estabilidad de los 8 péptidos previamente identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727. Para ello, los 8 péptidos se han sintetizado químicamente y se han sometido a dos etapas de hidrólisis simulando las condiciones en las que tiene lugar la digestión fisiológica. Tras la incubación de los péptidos con pepsina, simulando el proceso de digestión del estómago, y con Corolasa PP[®] (tripsina, quimiotripsina, carboxi y aminopeptidasas), simulando las condiciones en que tiene lugar la digestión en el intestino, los hidrolizados se analizaron por RP-HPLC-MS/MS y se secuenciaron los fragmentos liberados por acción de las enzimas gastrointestinales. Asimismo, se determinó la actividad IECA de los péptidos hidrolizados comparándose con la actividad que presentaban los péptidos antes de la digestión. Estos resultados se encuentran resumidos en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Comportamiento de los péptidos con actividad IECA identificados en el permeado de 3000 Da procedente del extracto soluble en agua de la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 en condiciones de simulación gastrointestinal. Secuencia y actividad IECA de los péptidos liberados después de la digestión.

Secuencia	IC ₅₀ (mg/ml) ^a		Grado de hidrólisis	Fragmentos liberados después de la digestión
	Antes de la digestión	Después de la digestión		
LHLPLP	0,004	0,004	No hidrolizado	
LHLPLPL	0,340	0,014	Parcialmente hidrolizado	LHLPLPL; LHLPLP
VVVPPF	>1,0	0,770	Parcialmente hidrolizado	VVVPPF; VVVPP; PPF
LTQTPVVVPPF	>1,8	0,430	Parcialmente hidrolizado	LTQTPVVVPPF; LTQTPVVVPP; VVPPF; LTQTPV
VRGPFPIIV	0,600	0,310	Parcialmente hidrolizado	VRGPFPIIV; VRGPFPII; VRGPFPIIV; GPFPI
LVYPPFGPIPNSLPQNIPP	0,010	0,170	Hidrolizado	LVYPPFGPIPN; YPPFGPIP
VLGPVRGPF	0,140	0,590	Hidrolizado	LGPVR; VLGPV; GPF; GPVRG;
VLGPVRGPFPIIV	>1	2,24	Hidrolizado	GPFPIIV; GPFPI

De los 8 péptidos ensayados, solamente el péptido derivado de la β -caseína (133-138), LHLPLP, fue resistente a la hidrólisis con las proteasas digestivas. Se sabe que la presencia del aminoácido Pro en la secuencia de los péptidos les confiere resistencia frente a las enzimas proteolíticas (Kim y col., 1972; Vermeirssen y col., 2004).

Los péptidos LHLPLPL, VVVPPF, LTQTPVVPPF y VRGPFPIIV, se hidrolizaron parcialmente (**Figura 18a, 18b, 18c y 18d**) y su actividad IECA aumentó después de la digestión (**Tabla 15**). El caso más significativo fue el del péptido LHLPLPL que perdió la Leu C-terminal liberándose el péptido LHLPLP (aproximadamente un 32% de la concentración inicial del LHLPLPL) (**Figura 18a**). La actividad del LHLPLPL hidrolizado aumentó aproximadamente 23 veces. De hecho, esta secuencia posee una moderada actividad antihipertensiva en SHR a pesar de su baja actividad IECA, lo que podría explicarse por la pérdida del aminoácido Leu *in vivo* (Miguel y col., 2006). La capacidad para inhibir la ECA de los péptidos VVVPPF y del LTQTPVVPPF aumentó ligeramente tras la digestión, probablemente debido a la formación de los fragmentos VVVPP (**Figura 18b**) y LTQTPVVPP (**Figura 18c**) que contienen el tripéptido VPP en su extremo C-terminal. Se ha comprobado que la secuencia VPP exhibe una potente actividad IECA y posee efecto antihipertensivo en animales y en humanos (Nakamura y col., 1995b; Hata y col., 1996; Sipola y col., 2001; Seppo y col., 2003). Cabe destacar, que aunque los péptidos VVVPPF y LTQTPVVPPF no mostraron actividad IECA *in vitro* ($IC_{50} > 1500 \mu M$), podrían ser candidatos para ejercer una posible actividad antihipertensiva *in vivo* como consecuencia de la liberación de secuencias con actividad durante la digestión gastrointestinal. Sería por tanto interesante probar el efecto de estos péptidos en animales. Otros autores también han demostrado que durante la digestión se pueden formar péptidos activos. Así, Maeno y col., 1996, encontraron que la secuencia KVLPVPE correspondiente al fragmento 169-175 de la β -caseína, con un $IC_{50} > 1000 \mu M$, mostraba una potente actividad antihipertensiva en SHR. Sus resultados sugerían que la pancreatina liberaba a partir de este péptido el fragmento KVLPVP que presentaba una gran capacidad para inhibir la ECA ($IC_{50} = 5 \mu M$). Por último, la actividad del péptido VRGPFPIIV que también se hidrolizó parcialmente aumentó 2 veces después de la hidrólisis. Esta secuencia no disminuyó la presión arterial cuando se suministró por vía oral a SHR (Miguel y col., 2006).

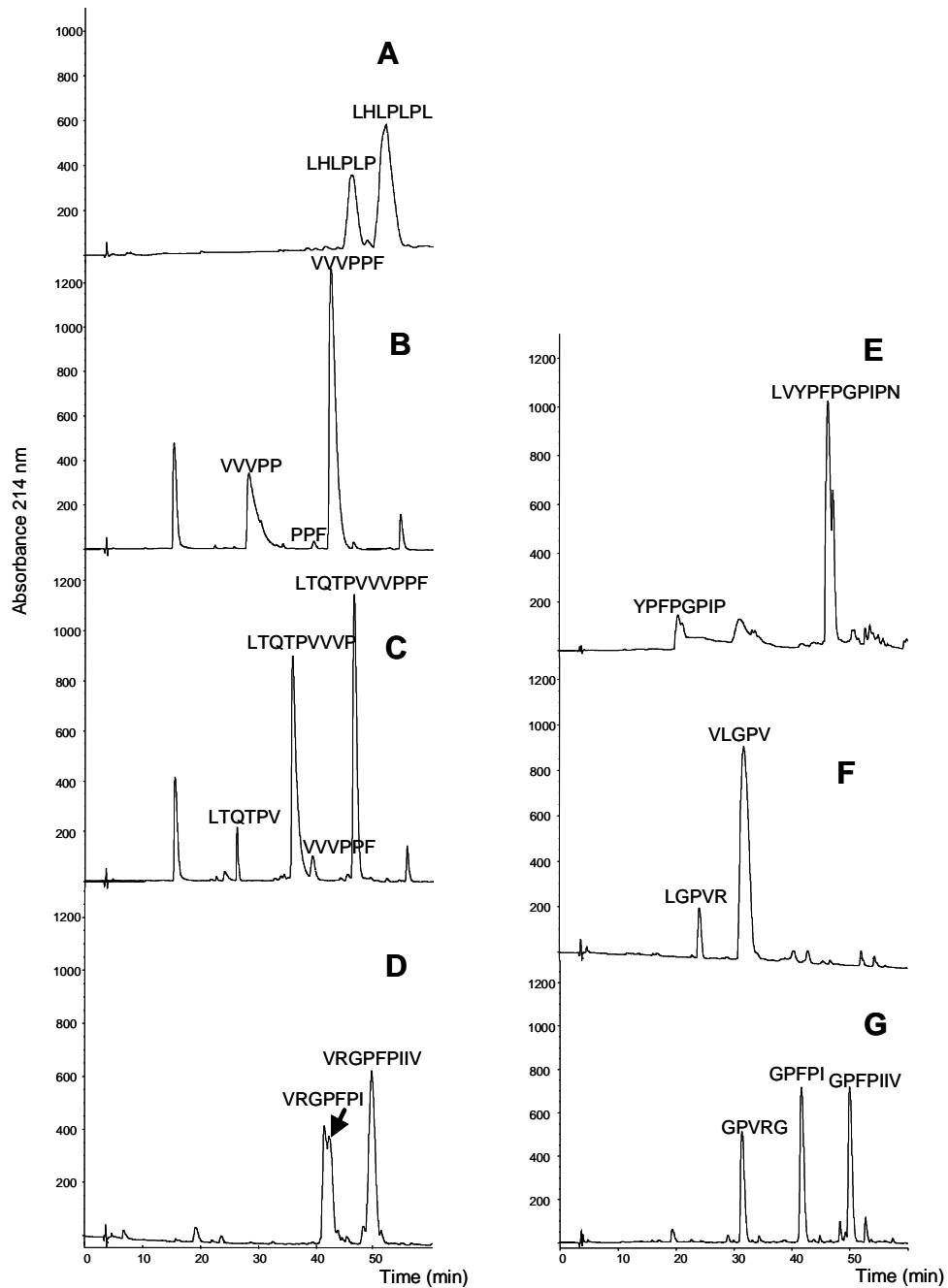


Figura 18. Cromatogramas de RP-HPLC de los péptidos sintéticos que se hidrolizaron tras la simulación de la digestión gastrointestinal **(A)** LHLPLPL **(B)** VVPPF **(C)** LTQTPVVVPF **(D)** VRGPFPII **(E)** LVYFPFGPIPN **(F)** VLGPVRGPFPI **(G)** VLGPVRGPFPIIIV

Los péptidos con secuencias LVYPPFGPIPNQLPQNIIP, VLGPVRGPFPP y VLGPVRGPFPIIV se hidrolizaron totalmente (**Figuras 18e, 18f y 18g**) tras la incubación con las enzimas digestivas. El péptido inhibidor de la ECA de 19 aminoácidos, LVYPPFGPIPNQLPQNIIP, se hidrolizó completamente liberándose como fragmento principal el péptido LVYPPFGPIPN (**Figura 18e**), el cual contiene en su secuencia el fragmento YPPFGPIPN previamente identificado por Saito y col., (2000) en queso Gouda madurado durante 8 meses, que mostró un IC₅₀ de 14,1 µM. Como muestra la **Tabla 15** la actividad del LVYPPFGPIPNQLPQNIIP disminuyó 18 veces después de la digestión. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los experimentos *in vivo*, que muestran que esta secuencia a pesar de presentar la misma capacidad para inhibir a la ECA *in vitro* que el péptido LHLPLP, posee una actividad antihipertensiva en SHR menor, y causa una disminución de la presión arterial sistólica en el tiempo que sigue un patrón diferente al del péptido LHLPLP (Quirós y col., 2006). Otros autores sugieren que la bioactividad de los péptidos de pequeño tamaño podría conservarse durante el proceso de digestión gastrointestinal, pero que en el caso de secuencias de mayor longitud sería necesario que contaran con una protección para escapar a la acción de las enzimas digestivas y poder ejercer así un efecto fisiológico en el organismo (Roufik y col., 2006). Los péptidos VLGPVRGPFPP y VLGPVRGPFPIIV también fueron hidrolizados totalmente tras la acción de las enzimas digestivas (**Figura 18f y 18g**) y su capacidad para inhibir a la ECA disminuyó o prácticamente no varió.

En conclusión, de los 8 péptidos identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727 sólo la secuencia LHLPLP fue resistente a las proteasas gastrointestinales, por lo tanto, este hexapéptido podría alcanzar intacto el epitelio intestinal, absorberse y pasar al torrente circulatorio. La secuencia LVYPPFGPIPNQLPQNIIP fue hidrolizada completamente por las enzimas digestivas y su actividad IECA disminuyó. La capacidad para inhibir la ECA de los péptidos LHLPLP, VVPPF, LTQTPVVPPF y VRGPFPIIV, aumentó después de la digestión, por lo que estos péptidos podrían ser potenciales candidatos para ejercer un efecto *in vivo*.

2.4.2. Evaluación de la absorción intestinal y del mecanismo de transporte de los péptidos LHLPLP y HLPLP

Se planteó la evaluación de la resistencia del LHLPLP a las peptidasas de la pared intestinal y el estudio de la absorción y del mecanismo de transporte de este péptido a través del epitelio mediante la utilización de células Caco-2; una línea de células procedente de un carcinoma colorectal humano que se ha establecido como modelo del epitelio del intestino delgado.

Resistencia a las peptidasas del epitelio intestinal

Se evaluó la concentración del péptido en las soluciones de la parte apical y basolateral tras añadir una concentración de 1 mM de péptido sintético LHLPLP a la cámara apical incubándose a una temperatura de 37°C durante diferentes periodos de tiempo (0, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos). La cuantificación se realizó por RP-HPLC-MS/MS siguiendo el método cuantitativo desarrollado en el apartado 2.3 con algunas modificaciones para aumentar la sensibilidad del método y poder detectar pequeñas cantidades de péptido (ver materiales y métodos apartado 9.3). La ecuación lineal ($y = 10,473E6 - 6,115E6X$; $R^2 = 0,994$) se empleó para determinar la concentración del péptido en las muestras. La incubación del péptido LHLPLP en la parte apical de la monocapa de células Caco-2 mostró que las peptidasas de la pared intestinal hidrolizaban el enlace entre la Leu y la His, liberándose el péptido HLPLP (**Figura 19**). El pentapéptido aparecía en 3 minutos aproximadamente y su concentración aumentaba con el tiempo de incubación hasta los 60 minutos (**Figura 19**). La membrana del intestino es especialmente rica en actividad aminopeptidasa lo que provee una actividad funcional complementaria a la actividad carboxipeptidasa del jugo pancreático. Otros autores también han observado que los péptidos que contienen Leu en su extremo N-terminal son muy susceptibles a la hidrólisis de las peptidasas celulares (Satake y col., 2002).

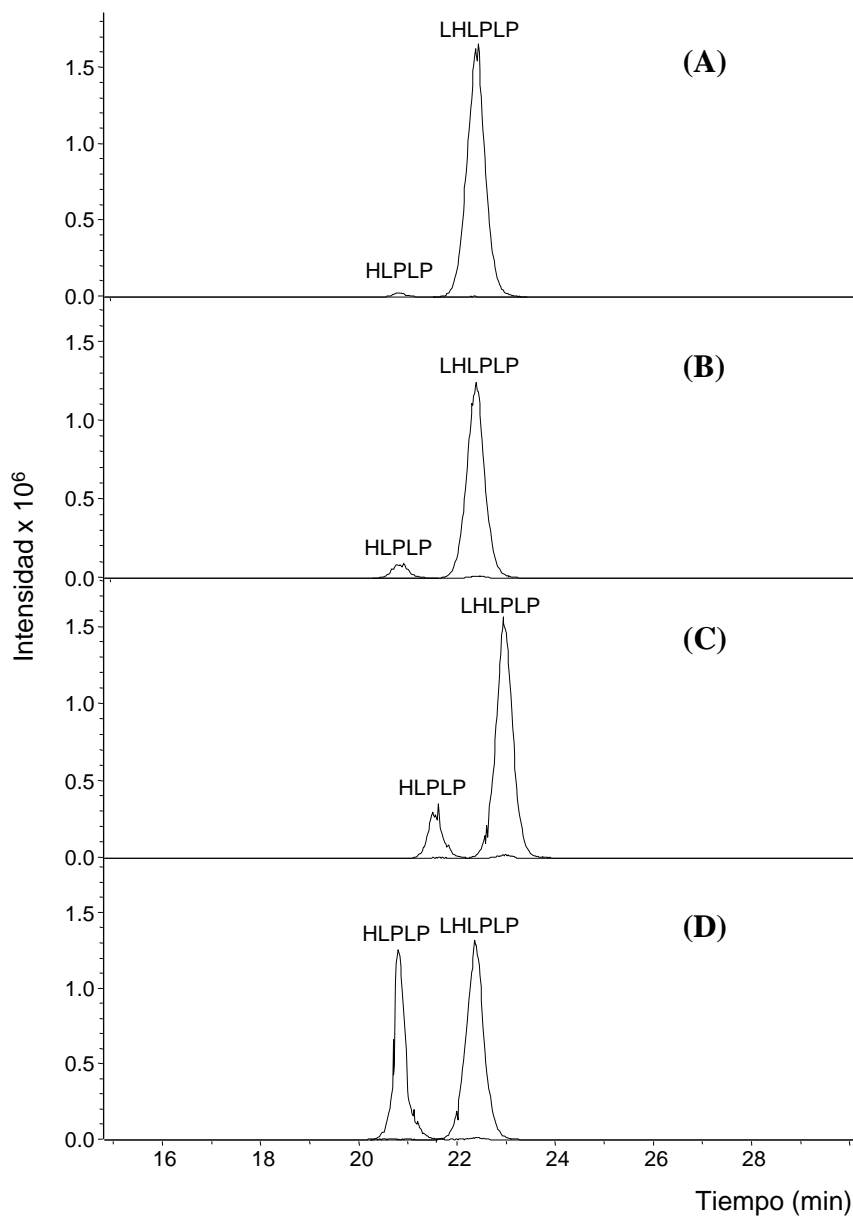


Figura 19. Extracción de los iones moleculares correspondientes al péptido LHLPLP con m/z 689,4, y al péptido HLPLP con m/z 576,3, obtenidos mediante el análisis por RP-HLPC-MS/MS de las soluciones apicales procedentes de la incubación del péptido LHLPLP en la monocapa de células Caco-2 a distintos tiempos, (A) 3 minutos (B) 10 minutos (C) 30 minutos y (D) 60 minutos.

Flujo transepitelial del péptido LHLPLP y HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2

Los análisis de las soluciones basolaterales procedentes de la incubación del péptido LHLPLP a distintos tiempos mostraron que cuando el LHLPLP se sometía a un flujo transepitelial, se detectaba el péptido en la zona basolateral alcanzándose la saturación aproximadamente a los 10 minutos de la incubación (aproximadamente un 0,01% de la concentración inicial teórica o un 0,018% de la concentración experimental). De especial interés fue que el péptido HLPLP producido previamente en la zona apical alcanzaba rápidamente la zona basolateral y su concentración aumentaba con el tiempo. Se decidió añadir HLPLP directamente a la cámara apical incubándose a 37°C y a los mismos tiempos que el péptido LHLPLP. El análisis de las soluciones apicales mostró que el péptido HLPLP no se hidrolizaba por las peptidasas celulares. Se sabe que los péptidos que contienen las secuencias XP y XPP son especialmente resistentes a la proteólisis *in vivo* (Masuda y col., 1996; Mizuni y col., 2004). La **Figura 20** muestra la absorción del péptido HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2 cuando LHLPLP o HLPLP se añadían a la solución apical. Como se puede observar, la tasa de transporte era mayor cuando se adicionaba el péptido HLPLP, y una pequeña cantidad de este pentapéptido se transportaba rápidamente a la solución basolateral (aproximadamente en 3 minutos). Este transporte tan rápido no se observó cuando se añadió LHLPLP a la solución basolateral, probablemente porque las peptidasas deben transformar al hexapéptido en HLPLP antes de la absorción.

Debido a que el péptido HLPLP se absorbía más rápidamente y en mayores cantidades que el péptido LHLPLP, se estableció la hipótesis de que el HLPLP podría ser la forma activa *in vivo* del hexapéptido y por lo tanto el HLPLP se eligió para llevar a cabo los siguientes experimentos. Así, se evaluó el flujo transepitelial de este péptido midiendo su concentración en la solución basolateral. En primer lugar, se evaluó el efecto que tenía la concentración de HLPLP en la solución apical en el transporte transepitelial después de 60 minutos de incubación. Como muestra la **Figura 21**, el transporte de HLPLP fue dependiente de la concentración y no se observó saturación cuando la concentración del péptido en la solución apical fue menor de 3 mM.

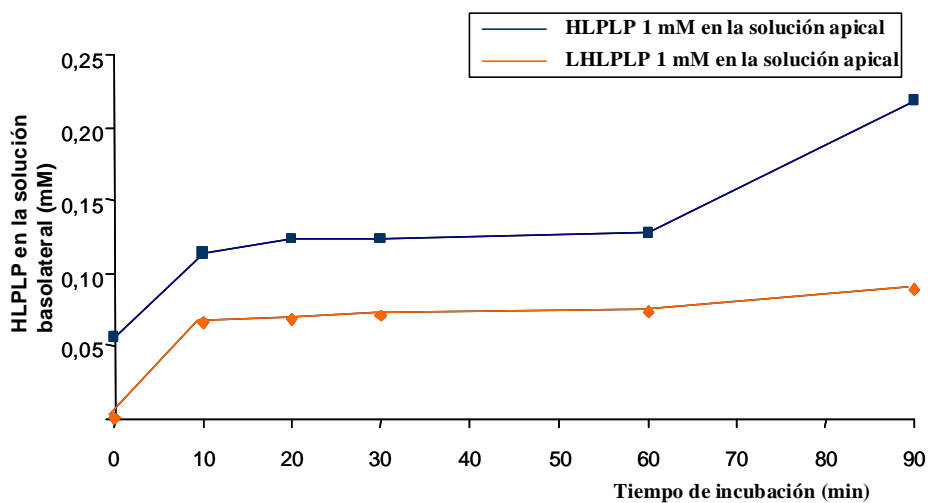


Figura 20. Transporte del péptido HLPLP a diferentes tiempos a través de la monocapa de células Caco-2. En el minuto 0 se añadió LHLPLP (1 mM) o HLPLP (1 mM) en la solución apical. La concentración de HLPLP en la solución basolateral se determinó por RP-HPLC-MS.

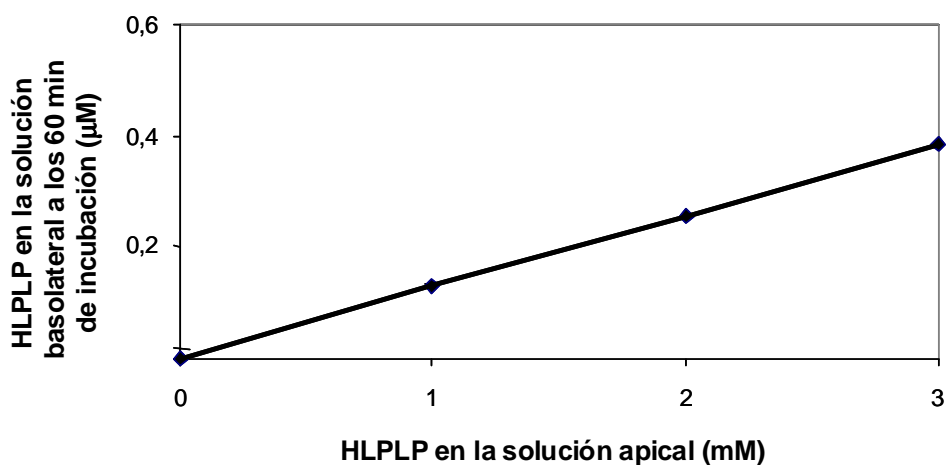


Figura 21. Transporte dosis-dependiente del péptido HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2.

Transporte transepitelial del péptido HLPLP

El siguiente objetivo fue determinar si el péptido HLPLP se transportaba a través de las células del epitelio intestinal mediante alguno de los tres mecanismos que se conocen para el transporte de oligopéptidos; a través de un transportador; por trancitosis o por vía paracelular. El péptido transportador 1 (PepT1) es un transportador intestinal acoplado a un gradiente de protones de los enterocitos de los mamíferos, y sirve de medio de transporte no sólo de di- y tri- péptidos si no también de diferentes fármacos y pro-fármacos (Okano y col., 1984; Fei y col., 1994; Brandsch y col., 2004). La trancitosis es un sistema de transporte mediado por las vesículas celulares que poseen ligandos específicos, ligandos adsorbentes no específicos o fluidos que se han descrito como medio de transporte de ciertos péptidos (Shimizu y col., 1997). El transporte paracelular a través de los espacios intercelulares tiene lugar mediante una difusión pasiva independiente de energía y es el mecanismo de una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular incluyendo distintos péptidos (Peppenheimer y col., 1994; Sakate y col., 2002). Así, se determinó el flujo apical-basolateral (AP-BL) del péptido HLPLP en presencia de glicilsarcosine (Gly-Sar) (10 mM) que es un sustrato competitivo del transportador PepT1, de Worthmanin (500 nM), que es un inhibidor de la fosfoinosidite 3-Kinasa que inhibe la trancitosis en células polarizadas y de Cytochalasin D (0,5 µg/mL), que es un fármaco que afecta a las uniones intercelulares. Como se puede observar en la **Figura 22**, el flujo de HLPLP no se redujo en presencia de Gly-Sar ni de Worthmanin, indicando que el transporte mediado por PepT1 y el transporte mediado por vesículas no es la ruta principal para el transporte transepitelial del HLPLP. Sin embargo, en presencia de Cytochalasin D, el flujo transepitelial del HLPLP aumentó dos veces. Estos resultados sugieren que la ruta principal para el transporte del HLPLP es la paracelular mediante una difusión pasiva. Es conocido, que la vía paracelular es una ruta de transporte no degradativa, de manera que las proteínas y péptidos que se transportan por medio de esta ruta se mantienen intactos (Shimizu, 2004).

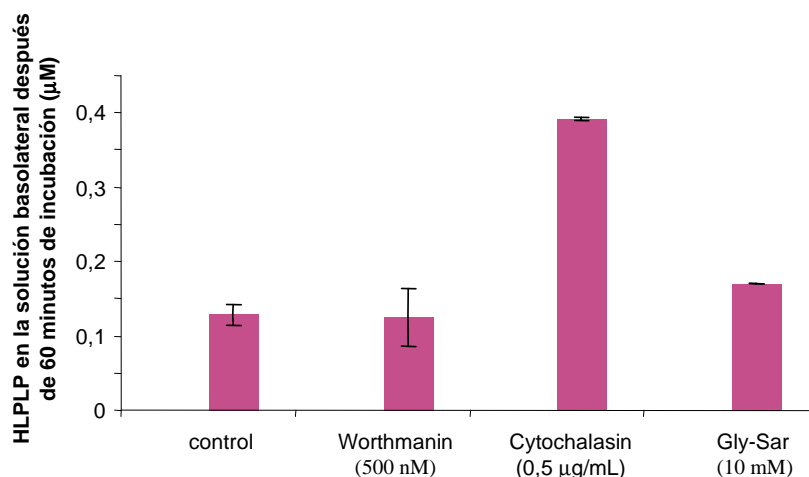


Figura 22. Efecto del Worthmanin (inhibidor de la trascitosis), Gly-Sar (Sustrato para el transportador PepT1) y Cytochalasin D (agente que abre las uniones intercelulares), en el transporte del péptido HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2. Cada valor está expresado como valor principal \pm el error estándar ($n=3$).

Transporte apical-basolateral y basolateral-apical del HLPLP

Para confirmar que el transporte paracelular es la principal ruta a través de la cual se absorbe el HLPLP se comparó el flujo AP-BL con el flujo basolateral-apical (BL-AP) (**Figura 23**). Aunque se han encontrado algunas diferencias entre el transporte activo a través de péptidos transportadores acoplados a un gradiente de protones en la zona apical y los péptidos transportadores de la zona basolateral (Irei y col., 2004; Terada y col., 1999), no se han encontrado diferencias significativas en el flujo transepitelial de otros péptidos a través de la ruta paracelular (Sakate y col., 2002). No se encontraron diferencias significativas en el flujo AP-BL y BL-AP (**Figura 23**), confirmándose que la difusión pasiva a través de una ruta paracelular es la principal ruta para el transporte transepitelial del péptido HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2. Aproximadamente un 0,05% de HLPLP añadido a la solución apical se transportó a la solución basolateral en 60 minutos.

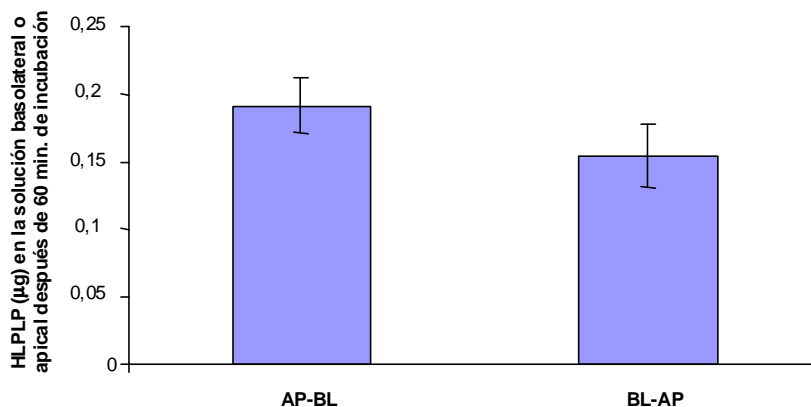


Figura 23. Flujo apical-basolateral (AP-BL) y basolateral-apical (BL-AP) del HLPLP a través de la monocapa de células Caco-2. Se adicionó una concentración de 1 mM de HLPLP a la solución apical o basolateral y la cantidad (μg) de HLPLP en la solución basolateral o apical se determinó a los 60 minutos de incubación. Cada valor está expresado como valor principal \pm el error estándar ($n=3$).

La ruta paracelular, es la principal ruta para la difusión pasiva a través del epitelio del ileón de los mamíferos y la complejidad molecular de las uniones intercelulares parece ser la mayor barrera para que se de el transporte de sustancias a través de esta ruta (D'Atri y Citi, 2002). Las uniones intercelulares son dinámicas y las células de absorción intestinal pueden modular la estructura y la función de las uniones mediante un mecanismo dependiente del citoesqueleto (Marada y col., 1983, 1986; Mitic y col., 2000). Se ha descrito que varios estímulos extracelulares que afectan a las uniones entre células, incluyendo algunos nutrientes, el interferon- γ y las citoquinas (Nurast y col., 2000; Madara y Stafford, 1989; Watson y col., 2005; Youakim y ahdieh, 1999). Por lo tanto, el transporte paracelular de compuestos de pequeño tamaño *in vivo* es mayor que el que se determina como aproximación *in vitro* mediante el modelo de monocapa de células Caco-2 (Conradi y col., 1993). Esto podría indicar que incluso cuando el flujo de HLPLP es muy bajo en el modelo de células Caco-2, el flujo transepitelial *in vivo* podría ser mucho mayor.

En conclusión, los resultados obtenidos con el modelo de células Caco-2 sugieren que el LHLPLP es hidrolizado por las peptidasas celulares dando lugar al péptido HLPLP el cual se transporta a través de la monocapa de células Caco-2 siendo la difusión pasiva por vía paracelular el principal mecanismo de transporte de este péptido. Este péptido presenta una actividad IECA muy potente con un IC_{50} de 21 μM y

actividad antihipertensiva en SHR por lo que podría ser el responsable de la actividad antihipertensiva que muestra el LHLPLP cuando se admistra a SHR (Quirós y col., 2006). Hay que destacar que la secuencia HLPLP se ha identificado también en leche humana sometida a una digestión gastrointestinal *in vitro* (Ver apartado 3 de Resultados y Discusión). Esta secuencia se encuentra en una región de la β -caseína muy conservada en distintas especies de mamíferos y su formación durante la digestión podría tener algún significado fisiológico.

2.4.3. Resistencia de los péptidos LHLPLP y HLPLP a las peptidasas plasmáticas

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los péptidos LHLPLP y HLPLP frente a las peptidasas plasmáticas se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro*. En primer lugar se incubó el péptido LHLPLP con plasma de rata a distintos tiempos hasta 24 horas según el método de Matsui y col., (2000) y las muestras se analizaron por RP-HLPC-MS/MS. Como se observa en la **Figura 24**, el péptido LHLPLP se hidrolizaba rápidamente por las peptidasas plasmáticas formándose el pentapéptido HLPLP que en estas condiciones experimentales permanecía intacto al menos durante 6 horas. También se detectó una pequeña concentración del tripéptido HLP a las 4, 6 y 8 horas de incubación. Matsui y col. (2000), encontraron que el tripéptido IVY se comportaba de manera similar cuando se incubaba en plasma de rata y en plasma humano, por lo que cabría esperar que el HLPLP se forme también cuando el LHLPLP sea hidrolizado por las proteasas del plasma humano.

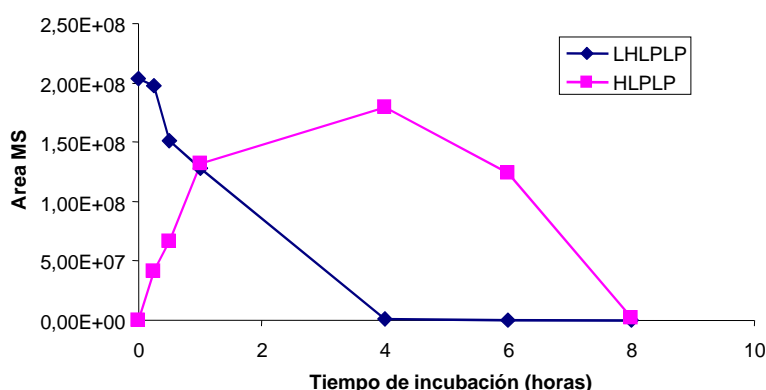


Figura 24. Hidrólisis del péptido LHLPLP y formación de su fragmento HLPLP en plasma de rata durante 8 horas de incubación.

El siguiente paso fue incubar el péptido HLPLP en plasma humano siguiendo el método de Matsui y col., (2000). Con este procedimiento el péptido permaneció intacto hasta las 24 horas de incubación, por lo que se decidió incubar el péptido en plasma a concentraciones más bajas (0,4 mg/mL) en las mismas condiciones que en caso anterior. La **Figura 25** muestra el comportamiento del HLPLP en plasma humano durante 24 horas, la concentración viene expresada como el área correspondiente a la extracción del ión molecular del péptido con m/z 576,3 y a sus aductos de sodio con m/z 598,3 y 620,3. Como se puede observar en la figura, el péptido permaneció prácticamente intacto durante la primera hora de incubación, a las 2 horas la concentración se redujo aproximadamente a la mitad y a las 4 horas prácticamente desapareció. A las 6 horas aunque se detectó el péptido no fue posible cuantificarlo. Aunque con este método *in vitro* no podemos asegurar el tiempo de permanencia del péptido en el torrente circulatorio, los resultados muestran que este péptido es muy resistente a la hidrólisis con las péptidasas plasmáticas. De hecho, el péptido HLPLP se encontró en muestras de plasma humano obtenidas en un estudio realizado con pacientes sanos que consumieron una leche fermentada enriquecida en péptido con actividad IECA (Platerink y col., 2006). Walsh y col., (2004), encontraron que el fragmento antihipertensivo 142-148 de la β -lactoglobulina a una concentración de 1,7 mg/mL de suero se degradaba rápidamente en 60 minutos de incubación.

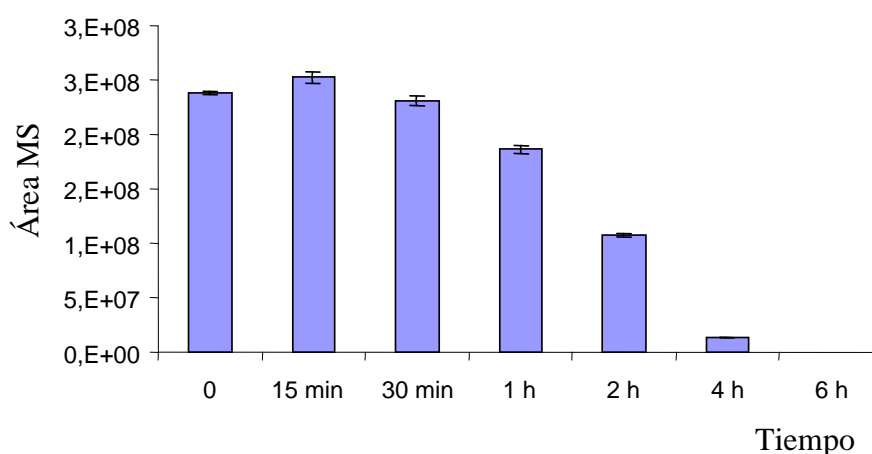


Figura 25. Incubación del péptido HLPLP con plasma humano. Las muestras se analizaron por RP-HPLC-MS/MS determinándose el área del pico correspondiente al ión molecular del péptido con m/z 576,3 y sus aductos con m/z 598,3 y 620,3.

2.4.4. Búsqueda en plasma del LHLPLP tras su administración oral a SHR

Se investigó la presencia del péptido LHLPLP en plasma de rata tras la administración oral del mismo a SHR mediante RP-HPLC-MS/MS. Tras la administración oral del péptido LHLPLP a 4 ratas SHR, se tomaron muestras de sangre según se describe en el apartado 9.5 de materiales y métodos. En los análisis de las muestras de plasma obtenidos a los tiempos 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración del péptido no se detectó ni el péptido ni ninguno de sus fragmentos. Asimismo, tampoco se encontró el LHLPLP ni ninguno de sus fragmentos en una muestra de plasma obtenida a las 4 horas tras la administración oral del péptido a una SHR después su sacrificio. Estos resultados no se corresponden con los encontrados para los modelos de simulación *in vitro* que mostraban que el LHLPLP era resistente a las proteasas gastrointestinales y que su fragmento HLPLP podría absorberse a través de las células del epitelio intestinal, sin embargo no podemos descartar que el péptido se absorba ya que la concentración del péptido que pasa al torrente circulatorio podría estar en una concentración por debajo del límite de detección del método de RP-HPLC-MS/MS. Walsh y col., 2004, tampoco encontraron el fragmento antihipertensivo 142-148 de la β -lactoglobulina en plasma humano, sin embargo en este caso era lógico puesto que este péptido era susceptible a la incubación con las proteasas gastrointestinales y plasmáticas *in vitro*. La absorción de péptidos antihipertensivos a través del intestino se ha demostrado en algún caso. Por ejemplo, el tripéptido VPP se detectó en la aorta abdominal de SHR a las 6 horas de la administración oral de la leche fermentada Calpis® (Masuda y col., 1996), aunque en este caso no se estudió la presencia de este péptido en la circulación sanguínea.

La concentración de los péptidos en sangre va a depender de la cantidad que se absorba de ellos a través del intestino. Además, estos son degradados rápidamente por las dipeptidylpeptidasas IV/DP IV/CD 26 (Hartrodt y col., 1982; Kreil y col., 1983), una enzima localizada en muchos tejidos de los organismos mamíferos (Abbott y col., 1990); Tampoco está claro, de que manera contribuyen otras enzimas con una especificidad similar como por ejemplo las prolylendopentidasas, endopeptidasas

específicas de prolina y la enzimas que rompen en enlace amino terminal a prolina (Hartrodt y col., 1982; Schonlein y col., 1990). Estas enzimas hidrolizan los enlaces anteriores a Pro, pudiendo ser las responsables de la degradación del LHLPLP.

Otra posible explicación de por qué no se detectó el péptido en el plasma es que el tiempo de permanencia del péptido en la circulación sanguínea sea muy corto, acumulándose rápidamente en otros órganos. Este efecto ha sido observado por Matsui y col., 2004, con el dipéptido antihipertensivo VY que se eliminaba rápidamente del plasma acumulándose en diversos órganos (riñón, corazón, pulmón, aorta abdominal, arteria mesentérica e hígado). Lo mismo ocurre con el captopril cuya concentración en plasma desaparece a las 2 horas tras la administración del fármaco (Jarrott y col., 1982; Jankowski y col., 1995).

En resumen, de los estudios de biodisponibilidad se concluye que de los 8 péptidos identificados en la leche fermentada con *E. faecalis* CECT 5727, el péptido LHLPLP fue el único que resistió la hidrólisis con las enzimas gastrointestinales. Los estudios realizados con células Caco-2 sugieren que el LHLPLP se hidroliza por las peptidasas celulares dando lugar al péptido HLPLP el cual se transporta a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la difusión pasiva por vía paracelular el principal mecanismo de transporte de este péptido. El HLPLP es resistente a las peptidasas plasmáticas humanas en las condiciones ensayadas por lo que podría ser la forma activa del péptido LHLPLP. Sin embargo, ni el LHLPLP ni ninguno de sus fragmentos, incluyendo el HLPLP, se han podido encontrar en plasma de rata tras la administración del péptido LHLPLP.

2.5. Estudios enzimáticos del péptido LHLPLP

Para ejercer un efecto *in vivo*, los péptidos inhibidores de la ECA deben comportarse como verdaderos inhibidores de la ECA y no como sustratos de la enzima. Fujita y col., (2000) clasificaron los péptidos con actividad IECA en tres grupos dependiendo de su comportamiento tras la incubación con la ECA: los verdaderos inhibidores, cuyo IC_{50} no se ve modificado tras la incubación con la enzima, péptidos que son sustrato de la ECA y que por tanto son hidrolizados tras la incubación dando lugar a fragmentos que presentan baja actividad IECA, y péptidos que son convertidos en verdaderos inhibidores bien por la acción de la ECA o por las proteasas gastrointestinales.

Con el objetivo de investigar si el péptido LHLPLP, era un verdadero inhibidor o un sustrato de la ECA, el péptido se incubó con la enzima y la mezcla se analizó por RP-HPLC-MS/MS. Como muestran los cromatogramas de RP-HPLC del péptido antes y después de la incubación con la ECA (**Figura 26A**), el péptido no se hidrolizaba por la enzima, por lo que de acuerdo con Fujita y colaboradores, podría considerarse un inhibidor verdadero de la enzima. Otros péptidos inhibidores de la ECA también han mostrado ser verdaderos inhibidores de la enzima, como por ejemplo varios péptidos aislados a partir de queso Manchego (Gómez-Ruiz y col., 2004a). Por el contrario, un péptido inhibidor de la ECA con secuencia GFHGTGLHGF aislado a partir de músculo de pollo se hidrolizó en un porcentaje del 10% en presencia de la ECA y la actividad IECA de la solución del péptido después de la incubación con la enzima fue menor que la actividad IECA del péptido sin hidrolizar (Saiga y col., 2006).

Se investigó acerca del tipo de inhibición del LHLPLP. Para ello se realizaron dos experimentos a dos concentraciones diferentes de péptido y utilizando distintas concentraciones de sustrato, según se describe en el apartado 10 de materiales y métodos. La determinación de la cinética de inhibición se realizó a través de la representación de Lineweaver-Burk, representando la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la absorbancia a 228 nm producida por el ácido hipúrico. (**Figura 26B**). Como se puede ver en la representación de Lineweaver-burk las rectas

sin inhibidor y con inhibidor a 2 concentraciones distintas presentan un punto de intersección común en el eje y , lo que significa que el LHLPLP es un inhibidor competitivo de la ECA. Es decir, se une competitivamente al centro activo de la ECA y se observa una disminución en el porcentaje de inhibición a medida que aumenta la concentración del sustrato. La mayoría de péptidos inhibidores de la ECA identificados hasta el momento en proteínas alimentarias son inhibidores competitivos (Choi y col., 2001; Wu y col., 2002; Gómez-Ruiz y col., 2004a), aunque también nos encontramos con ejemplos de péptidos con actividad IECA identificados en alimentos que presentan una cinética de inhibición no-competitiva (Nakagomi y col., 1998; Saiga y col. 2006). En conclusión, el péptido LHLPLP se comporta como un verdadero inhibidor de la ECA y presenta un tipo de inhibición competitiva.

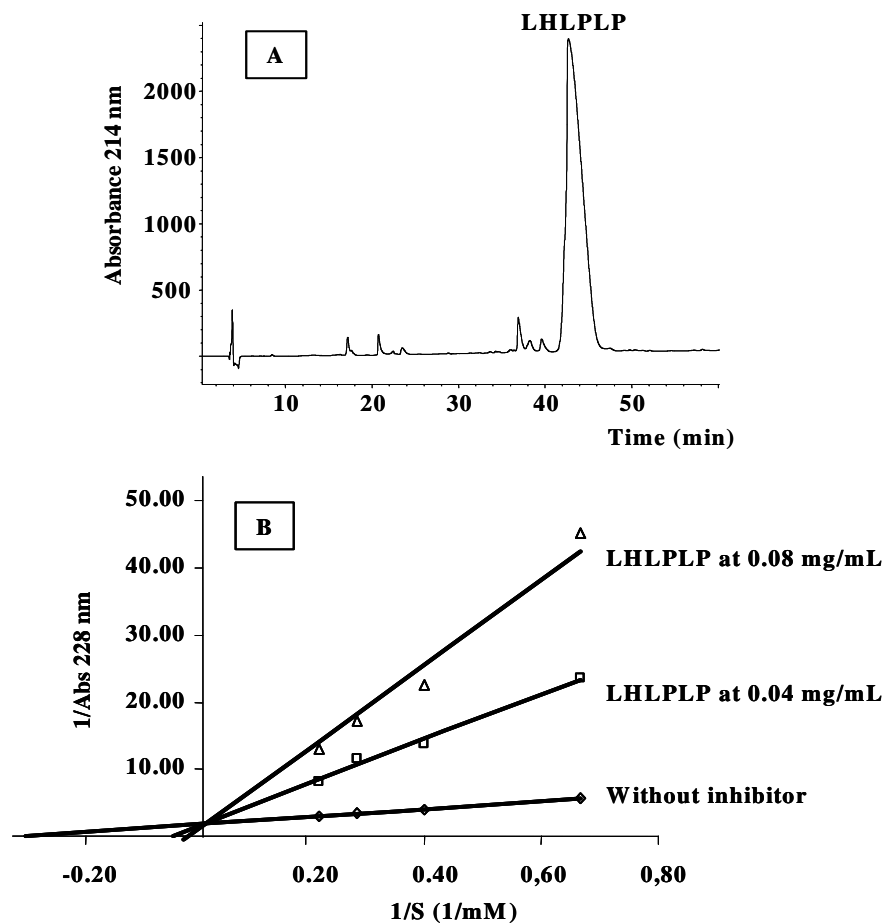


Figure 26. (A) Cromatograma de RP-HPLC del LHLPLP tras la incubación con la ECA **(B)** Representación de Lineweaver Burk de la actividad IECA en presencia del LHLPLP. Control (\diamond), péptido a 0,04 mg/ml (\blacksquare) y péptido a 0,08 mg/ml (\blacktriangle). Las representaciones de Lineweaver Burk plots a varias concentraciones de péptido son lineales y tienen un punto de intersección común en el eje y , lo que indica un tipo de inhibición competitiva.

2.6. Estudios de relación estructura/actividad IECA del péptido LHLPLP

Con el objetivo de estudiar la relación que existe entre la actividad y la naturaleza de los tres últimos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido LHLPLP, se sintetizaron varios péptidos similares al LHLPLP con sustituciones en los aminoácidos de la antepenúltima, penúltima y última posición, y se determinó su actividad IECA expresándola con el valor del IC_{50} (concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad original de la ECA) (**Tabla 16**). La relación entre la actividad y la estructura de diferentes péptidos inhibidores de la ECA indica que la unión con la enzima está fuertemente determinada por la secuencia tripeptídica C-terminal del sustrato (Cushman y Col., 1973).

Tabla 16. Actividad IECA de los péptidos sintéticos correspondientes a modificaciones en la estructura del péptido LHLPLP (los aminoácidos sustituidos se encuentran en negrita).

Péptido sintético	IC_{50} (μM) ^a
LHLPLP	5,5
LHLPLL	4,6
LHLPLR	1,0
LHLPAP	8,9
LHLPYP	4,3
LHLPGP	2,4
LHLYLP	15,7
LHLWLP	18,4

^a IC_{50} : concentración necesaria de péptido para inhibir el 50% de actuación de la ECA.

Para investigar la importancia del aminoácido C-terminal en la actividad IECA, se sintetizaron dos péptidos: el péptido LHLPLL donde la Pro se reemplazó por el aminoácido hidrofóbico Leu, y el péptido LHLPLR donde la Pro se sustituyó por un aminoácido cargado positivamente. La actividad del LHLPLL ($IC_{50} = 5,8 \mu M$) fue similar a la encontrada para el péptido original ($IC_{50} = 5,8 \mu M$). El aminoácido Pro como

residuo C-terminal ha demostrado aumentar la afinidad de los péptidos por la ECA (Cheung y col., 1980), sin embargo, la presencia de otro aminoácido hidrofóbico como es la Leu parece no afectar a la actividad final. Otros autores también han documentado que la presencia de un residuo de Leu en la posición C-terminal es favorable para la inhibición de la ECA (Gómez-Ruiz y col., 2004; Cheung y col., 1979). La actividad del péptido sintético LHLPLR con un IC_{50} de $0,9 \mu\text{M}$ fue 5 veces más potente que la actividad del LHLPLP. Los datos sobre la relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ECA sugieren que una carga positiva en el extremo C-terminal bien debida a el grupo guanidino o ϵ -amino de las cadenas laterales de los aminoácidos arginina o lisina, respectivamente, contribuyen sustancialmente a la potencia inhibitoria (FitzGerald y Meisel, 2000).

El residuo de Leu de la penúltima posición de la secuencia LHLPLP se sustituyó por Ala, Gly o Tyr. La capacidad inhibitoria del péptido LHLPP con un IC_{50} de $7,2 \mu\text{M}$, fue similar a la encontrada para el LHLPLP. Otros autores han demostrado que la sustitución de la secuencia Pro-Pro en el extremo C-terminal por la secuencia Ala-Pro en el potente inhibidor de la ECA EWPRQP procedente de veneno de serpiente aumenta la afinidad de este nonapéptido por la ECA (Cushman y col., 1973). De hecho, el captopril (D-3-mercaptopropanoyl-L-proline), un fármaco inhibidor de la ECA de uso común en el tratamiento de la hipertensión, es un análogo del dipéptido Ala-Pro y posee un IC_{50} de $0,006 \mu\text{M}$ (Mullally y col., 1996). De la misma forma, la actividad del péptido LHLPP con un IC_{50} de $5,2 \mu\text{M}$ no aumentó con respecto a la actividad del LHLPLP. Kohmura y col., (1989), encontraron varios péptidos con una alta capacidad inhibitoria de la ECA con el dipéptido Tyr-Pro en el extremo C-terminal, algunos de ellos con valores de IC_{50} por debajo de $5 \mu\text{M}$. El péptido LHLPP con un IC_{50} de $2,3 \mu\text{M}$ presentó una capacidad inhibitoria dos veces mayor que el LHLPLP. Minervini y col., (2003) encontraron una mezcla de péptidos con la secuencia C-terminal PGP en una fracción con actividad IECA obtenida a partir de un hidrolizado de caseinato sódico de cerdo con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* PR4 (Minervini y col., 2003). Por lo tanto, la actividad IECA del péptido LHLPLP no varió con la sustitución del aminoácido Leu en penúltima posición por los aminoácidos Ala y Tyr, sin embargo, cuando se sustituyó por Gly aumentó dos veces la actividad de dicha secuencia.

Para comparar como afecta la presencia de aminoácidos aromáticos o de Pro en la antepenúltima posición, se sintetizaron los péptidos LHLYLP y LHLWLP donde la Pro se sustituyó por Tyr y Trp. Estas secuencias presentaron valores de IC₅₀ de 17,2 y 17,3 μM respectivamente, lo que significa una capacidad IECA 3 veces menor que la que presentó la secuencia LHLPLP. La presencia de Pro como residuo en antepenúltima posición parece aumentar la afinidad de los péptidos por la ECA (Stevens y col., 1972; Rohrbach y col., 1981), aunque, se había descrito que un aminoácido aromático en esta posición también parece afectar positivamente a la capacidad inhibitoria de los péptidos.

En resumen, las modificaciones llevadas a cabo en la secuencia LHLPLP muestran que la sustitución de la Leu en penúltima posición por Gly, y la sustitución de Pro en la posición C-terminal por Arg, puede aumentar 2 y 5 veces la actividad IECA *in vitro* de la secuencia LHLPLP.

2.7. Obtención del péptido antihipertensivo LHLPLP mediante hidrólisis enzimática

El objetivo de esta parte del trabajo era llevar a cabo un estudio preliminar para la obtención del péptido LHLPLP o del péptido HLPLP mediante hidrólisis enzimática, de manera que este hidrolizado pudiera emplearse para elaborar un nuevo ingrediente funcional. La producción de estos péptidos mediante hidrólisis es de gran interés puesto que son secuencias con probada actividad IECA y antihipertensiva. La utilización de enzimas sería una alternativa a la utilización de *Enterococcus faecalis* para la producción del péptido LHLPLP por fermentación, ya que su uso en alimentos es todavía un motivo de controversia debido a su posible potencial patogénico como consecuencia de la presencia de uno o más factores de virulencia (Franz y col., 1999; 2001). Para la obtención de los péptidos LHLPLP o HLPLP mediante hidrólisis enzimática, se ha estudiado la utilización de distintas enzimas y distintos sustratos y se ha realizado un diseño experimental para determinar la condiciones óptimas del proceso de hidrólisis y obtener la máxima cantidad del péptido.

Con el fin de hallar una enzima cuya especificidad permitiera la obtención del péptido HLPLP con probada actividad IECA y antihipertensiva, se obtuvieron hidrolizados a distintos tiempos durante 24 horas (0, 0,5, 1, 2, 3, 5 y 24 horas) de caseinato sódico con distintas enzimas de origen digestivo: pepsina, quimiotripsina, Pancreatina 4XNF-P211P y Corolasa PP[®]; los dos últimos son dos preparados enzimáticos en polvo que proceden de páncreas de cerdo, y además de tripsina y quimiotripsina contienen diferentes actividades aminopeptidasa y carboxipeptidasa. Los hidrolizados se analizaron por RP-HPLC-MS/MS mediante la extracción de los iones moleculares correspondientes a los péptidos LHLPLP y HLPLP. Mediante la hidrólisis con Pancreatina 4XNF-P211P y Corolasa PP[®] se obtuvo el péptido HLPLP que aparece tras una hora de hidrólisis y su concentración aumenta hasta las 24 horas, además en ambos casos se obtenía el péptido HLPLPL. A modo de ejemplo la **Figura 27A** muestra el cromatograma del hidrolizado de caseinato sódico con corolasa PP durante 24 horas y la **Figura 27B** muestra la extracción de los iones con m/z 576,3 y 689,4, correspondientes a los péptidos HLPLP y HLPLP, respectivamente. La concentración de HLPLP en los hidrolizados de 24 horas de Pancreatina 4XNF-P211P

y Corolasa PP[®] era prácticamente la misma, por lo que se escogió la Corolasa PP[®] como enzima para la optimización del método de obtención del hidrolizado. En los hidrolizados con pepsina y quimiotripsina no se obtuvieron ninguno de los péptidos de interés. Otros péptidos antihipertensivos, en concreto el IPP y el VPP, producidos por fermentación con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, también se han obtenido por hidrólisis con una enzima de *Aspergillus Oryzae* (Matsuura y col., 2005). La compañía Calpis Co., comercializa la leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* y el hidrolizado de caseínas con *Aspergillus oryzae* con el nombre de AmealPeptide[®].

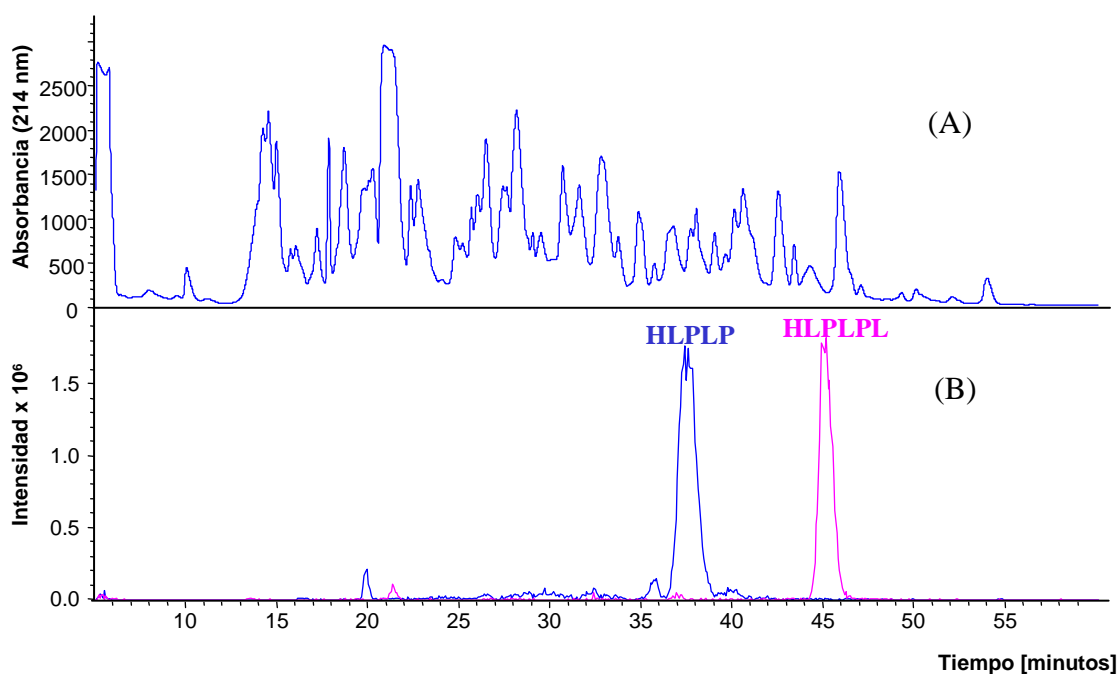


Figura 27. (A) Análisis mediante RP-HPLC con detector de ultravioleta a 214 nm del hidrolizado de caseinato sódico con Corolasa PP a las 24 horas **(B)** Extracción de los iones moleculares correspondientes a los péptidos HLPLP con m/z 576,3 y al péptido HLPLPL con m/z 576,3.

Una vez elegida la enzima para llevar a cabo la hidrólisis, se realizó un estudio con 4 sustratos diferentes: dos caseinatos sódicos (Induxtra y Sodial), un caseinato cálcico (Sodial) y un producto Promilk 852, para determinar el porcentaje de β -caseína que es la proteína precursora del péptido HLPLP. Para ello, se llevó a cabo un análisis de las caseínas por RP-HPLC de las 4 muestras seleccionadas siguiendo el método desarrollado por Visser y col., (1991). En la **Figura 28** se muestra el cromatograma del caseinato sódico (Sodial) donde aparecen identificadas las distintas caseínas. El

porcentaje de β -caseína se muestra en la **Tabla 17**. Este porcentaje se calculó mediante la cuantificación del área de los distintos picos cromatográficos correspondientes a las distintas caseínas. Como se puede observar en la **Tabla 17** los caseinatos sódicos presentaron un porcentaje de β -caseína similar e inferior al porcentaje que presentaron el caseinato cálcico y al producto promilk 852. Se eligió por tanto el caseinato cálcico como sustrato para llevar a cabo la hidrólisis.

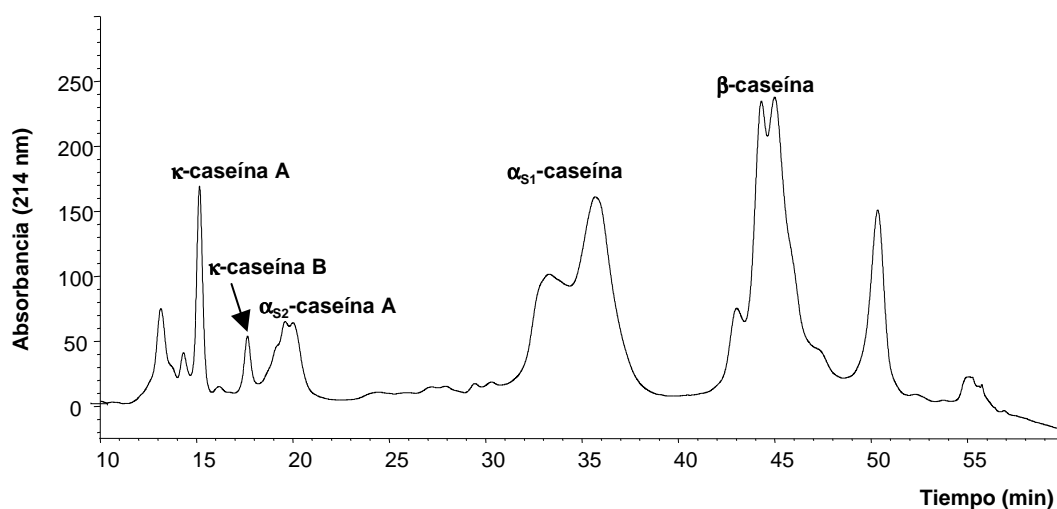


Figura 28. Análisis de caseínas mediante RP-HPLC con detector de ultravioleta a 214 nm del caseinato sódico (Sodial) mediante el método de Visser y col., (1991).

Tabla 17. Porcentaje de β -caseína en diferentes muestras de caseinato.

	% β -caseína
Caseinato sódico (Induxtra)	48,94
Caseinato sódico (Sodial)	47,07
Caseinato cálcico (Sodial)	59,88
Promilk 852	57,04

Con el objetivo de optimizar la producción del péptido HLPLP se realizó un diseño experimental cúbico centrado en las caras según se describe en el apartado 13 de materiales y métodos. Los factores que se estudiaron fueron el tiempo de hidrólisis, la concentración de Corolasa PP[®], y además se analizó el empleo de una peptidasa de origen fúngico en combinación con la Corolasa PP[®]. La peptidasa (Peptidasa 433P-P433P) producía la hidrólisis de los aminoácidos de los extremos N-terminal y C-terminal de una cadena de aminoácidos. Se pretendía ver si esta peptidasa fuera capaz de hidrolizar el péptido HLPLP liberando la Leu y produciéndose de esta manera una mayor concentración de HLPLP. La variable respuesta seleccionada fue la concentración del péptido HLPLP expresada como el área del pico correspondiente a la extracción del ión precursor del péptido y de sus aductos de sodio y de potasio obtenida mediante el análisis por RP-HPLC-MS/MS. La **Tabla 18** muestra la matriz del diseño con los niveles experimentales de las variables independientes (factores) y los valores obtenidos para la variable respuesta analizada. Los experimentos se realizaron de manera aleatoria.

Tabla 18. Matriz del diseño experimental

Nº Exp.	Corolasa PP [®] (mg/g proteína)	Peptidasa 433P-P433P (mg/g proteína)	Tiempo	Concentración de HLPLP*
1	20	0	4	3.05967e+007
2	60	0	4	8.31129e+007
3	20	20	4	3.73433e+007
4	60	20	4	4.56472e+007
5	20	0	24	1.01147e+008
6	60	0	24	1.61545e+008
7	20	20	24	0
8	60	20	24	0
9	20	10	14	3.86066e+007
10	60	10	14	3.83772e+007
11	40	0	14	1.36806e+008
12	40	20	14	4.57305e+006
13	40	10	4	4.51997e+007
14	40	10	24	7.45128e+006
15	40	10	14	3.79221e+007
16	40	10	14	3.77705e+007
17	40	10	14	3.58599e+007

* Concentración del péptido HLPLP expresada como el área del pico correspondiente a la extracción del ión precursor del péptido HLPLP con m/z 576,3 y de sus aductos de sodio y de potasio 598,3, 614,3 y 620,3 obtenida mediante el análisis de las muestras por RP-HPLC-MS/MS.

Los resultados obtenidos para la variable respuesta se sometieron a un análisis estadístico. En la **Figura 29** representa los coeficientes de regresión estandarizados de cada uno de los términos del modelo con sus intervalos de confianza al 90% ($p=0,10$), que dan una idea relativa de la importancia de cada uno de ellos. El R^2 fue 0,912 y el RSD 20621766.

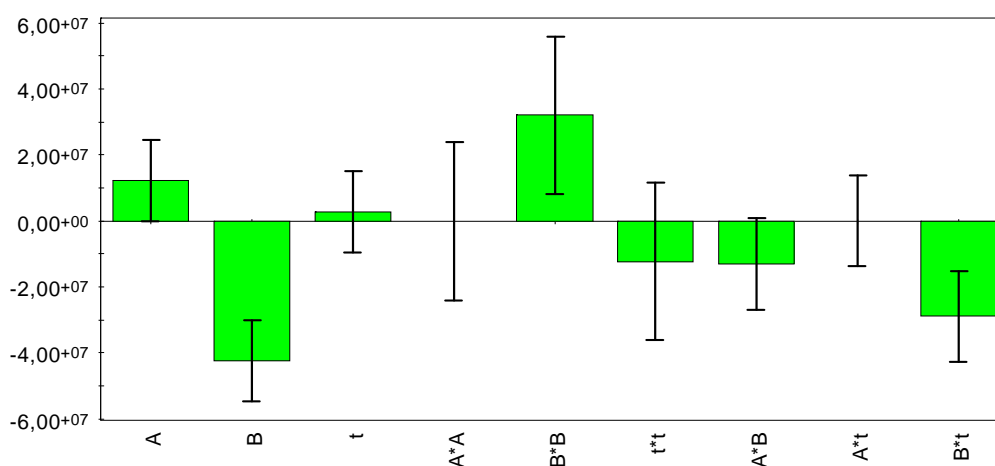


Figura 29. Diagrama de barras con los coeficientes de regresión de los términos del modelo y sus correspondientes intervalos de confianza.

A partir de la **Figura 29** se pone de manifiesto que los términos AA, At y tt pueden ser excluidos del modelo. Recalculando el modelo sin estos términos se obtienen los resultados que se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Coeficientes de regresión estimados para los términos del modelo y valores estadísticos para juzgar la bondad del ajuste.

Término	34455320.00	7011025.50	0.00
A	12098898.00	5865844.50	0.07
B	-42564396.00	5865844.00	0.00
t	2824371.75	5865843.50	0.64
B*B	25621786.00	9141258.00	0.02
A*B	-13076319.00	6558213.50	0.07
B*t	-28996642.00	6558212.00	0.00
R ²	0.898		
RSD	18549430		

En la tabla se puede observar la probabilidad con la significación estadística del coeficiente asociado con cada factor. El coeficiente de regresión del término lineal para el factor t no es estadísticamente significativo $p > 0,10$, sin embargo el programa Modde 5 no permite eliminar este término dado que la interacción Bt si es significativa lo que hizo que este término se mantuviera.

La **Figura 30** muestra las curvas de nivel respuesta obtenidas mediante el modelo calculado en función de los factores B (Peptidasa 433P-P433P) y t (tiempo) para los 3 valores de A (Corolasa PP®; 20, 40 y 60 mg/g proteína). En la figura se puede observar que el mayor valor para la concentración de péptido HLPLP se obtiene con valores altos de enzima Corolasa PP® y de tiempo, y con valores bajos de enzima Peptidasa 433P-P433P. Con el modelo calculado el programa facilita el Las condiciones óptimas de este diseño experimental para obtener la máxima concentración de HLPLP que son: una concentración de Corolasa PP® de 60 mg/g proteína sin el empleo de la peptidasa y un tiempo de hidrólisis de 24 horas. Para este punto se obtendría un valor a partir del modelo de $1,591 \times 10^8$ comparable con el obtenido experimentalmente que fue de $1,615 \times 10^8$.

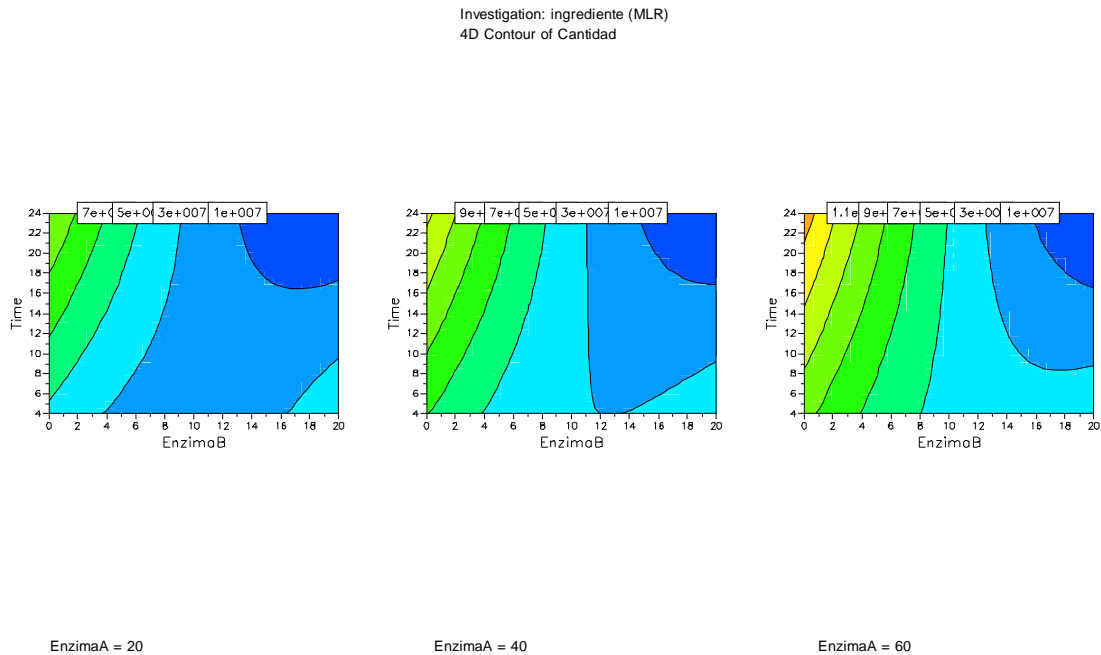


Figura 30. Curvas de nivel para la variable respuesta obtenidas mediante el modelo calculado en función de los factores B (Peptidasa 433P-P433P) y t (tiempo) para los 3 valores de A (Corolasa PP®; 20, 40 y 60 mg/g proteína).

De este apartado se concluye que el péptido HLPLP se obtiene mediante la hidrólisis enzimática de caseinato con Corolasa PP®. El diseño experimental mostró que las condiciones óptimas para obtener la máxima concentración de péptido se consiguen mediante el empleo de una concentración de Corolasa PP® de 60 mg/g proteína hidrolizando durante un tiempo de 24 horas.

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD IECA Y ANTIOXIDANTE EN LECHE HUMANAS Y FÓRMULAS INFANTILES SOMETIDAS A UNA SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL

Se sabe que algunas de las proteínas de la leche humana poseen distintas actividades fisiológicas, sin embargo existe muy poca información acerca de la degradación de estas proteínas una vez son ingeridas. La digestión puede afectar a las proteínas biológicamente activas produciendo modificaciones en su actividad biológica, o liberando fragmentos que pueden presentar, o no, nuevas propiedades bioactivas. En este apartado se ha investigado como afecta la digestión a las proteínas que contiene la leche humana mediante un proceso secuencial de hidrólisis con pepsina y pancreatina. El perfil peptídico resultante de la digestión se ha comparado con el obtenido tras la digestión de varias fórmulas infantiles. El estudio se ha centrado en la producción de secuencias biológicamente activas o precursores de las mismas. Finalmente se ha evaluado la contribución de ciertas secuencias a las actividades IECA y antioxidante halladas en las leches humanas digeridas.

Identificación de péptidos en leche humana hidrolizada con pepsina y pancreatina

Mediante ultrafiltración se obtuvo el permeado de 3000 Da del extracto soluble en agua de la leche humana antes y después de la digestión, y se sometió a un análisis por RP-HPLC-MS/MS. La **Figura 31A** muestra los cromatogramas de los permeados procedentes de la muestra de leche humana HM-7 antes y después de la hidrólisis. El cromatograma del permeado correspondiente a la leche sin digerir mostraba un escaso contenido en péptidos y la intensidad de la corriente total de iones que se obtuvo en el espectrómetro de masas era tan baja que no permitía llevar a cabo la identificación. Recientemente, Ferranti y col., (2004) han identificado varios péptidos en la fracción soluble de varias leches humanas recogidas en la primera semana después del parto tratadas con un 10% de tricloroacético. Para obtener suficiente cantidad muestra y poder llevar a cabo la identificación, estos autores realizaron un análisis por espectrometría de masas después de concentrar la fracción soluble en tricloroacético.

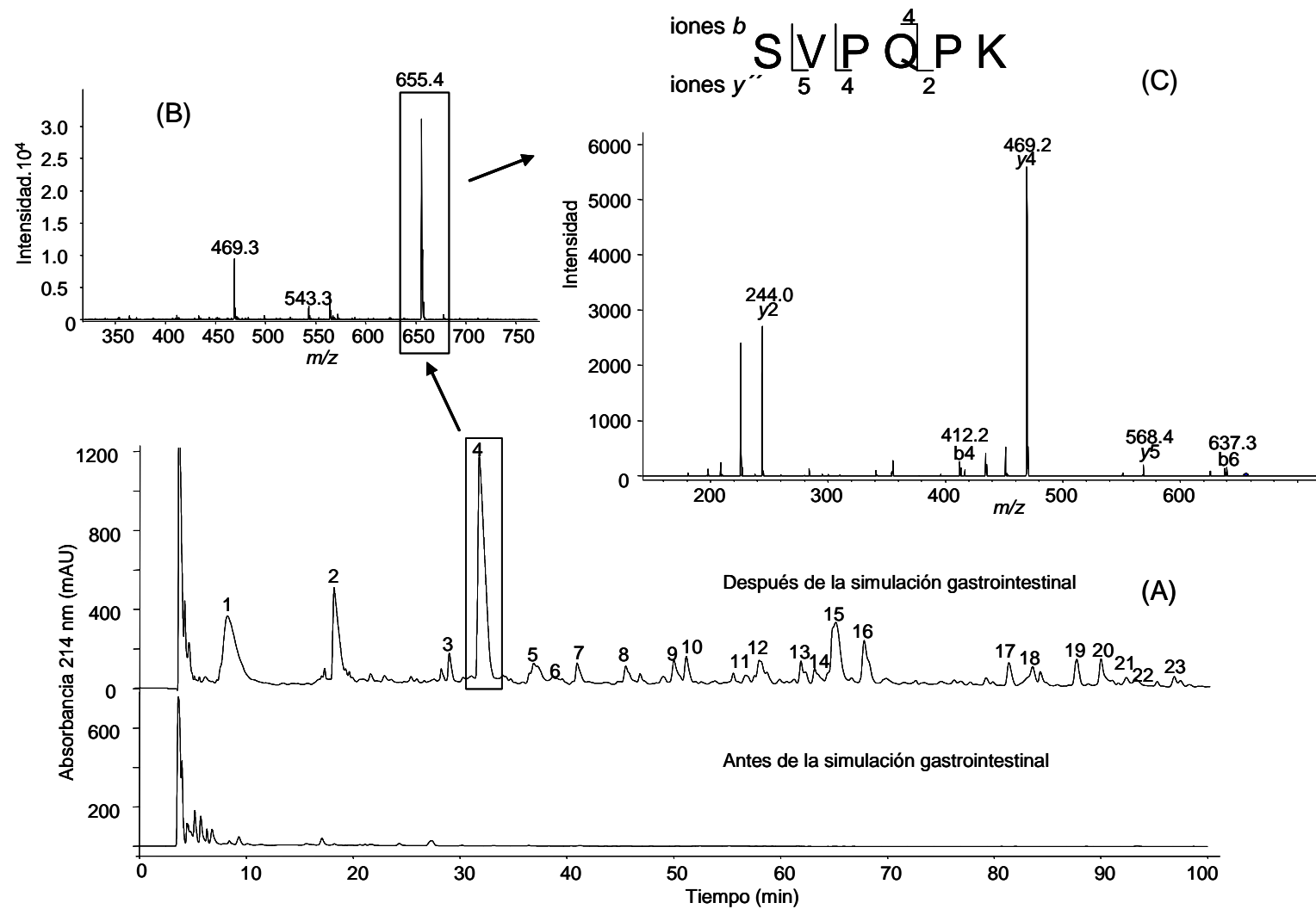


Figura 31. (A) Cromatogramas de RP-HPLC del permeado obtenido por ultrafiltración del extracto soluble en agua la leche humana HM-7 antes y después de la digestión con pepsina y pancreatina. **(B)** Espectro de masas del pico cromatográfico marcado en la **Figura 31A**. **(C)** Espectro de MS/MS del ión m/z 655,4. Este espectro se asignó al fragmento 155-160 de la β -caseína. La secuencia de este péptido se encuentra señalada con los fragmentos observados en el espectro. Para mayor claridad sólo se han etiquetado los iones tipo *b* y tipo *y*.

Después de la digestión de la leche humana se observó un aumento en el contenido de péptidos (**Tabla 20**). Los análisis del resto de muestras de leche humana después de su hidrólisis con pepsina y pancreatina, mostró un patrón peptídico similar. Como ejemplo, la **Figura 31A** muestra el perfil cromatográfico de una leche humana hidrolizada que corresponde a la semana 16 después del parto. Se consideraron un total de 23 picos cromatográficos para su secuenciación por espectrometría de MS/MS. El espectro de masas correspondiente al mayor pico cromatográfico se muestra en la **Figura 31B**. El espectro de fragmentación presenta dos fragmentos de mayor intensidad con m/z 469,2 y m/z 244,0 que fueron identificados como iones tipo y resultantes de la ruptura del enlace N-terminal adyacente a Pro (**Figura 31C**). La presencia de Val como residuo adyacente a Pro y la presencia de Lys en posición C-terminal favorece aparición de iones tipo y (Biemann, 1992; Breci y col., 2003). Siguiendo esta estrategia se identificaron la mayoría de los péptidos del permeado de la leche hidrolizada (**Tabla 20**). De los 23 péptidos identificados, 21 correspondían a fragmentos de la β -caseína y dos péptidos derivaban de la α -lactoalbúmina. Se sabe que la β -caseína y la α -lactoalbúmina son las proteínas más abundantes en la leche humana (Chtourou y col., 1985; Forsum, 1976). Ambas proteínas son además parcialmente susceptibles a las enzimas gástricas. Sin embargo, existen proteínas en la leche humana tales como las inmunoglobulinas, IgA secretora, heterómeros de α_{s1} -caseína, y componente secretor, que son particularmente resistentes a la proteólisis, incluso a pH 2.0 (Chatterton y col., 2004). Por lo tanto, es normal que los péptidos identificados deriven de la β -caseína y la α -lactoalbúmina. Varios de los péptidos identificados que proceden de la β -caseína son fragmentos del extremo C-terminal de esta proteína (**Tabla 20**). Recientemente, se ha demostrado que esta zona de esta proteína es más susceptible a la hidrólisis (Ferranti y col., 2004).

Se estudió la presencia de los péptidos identificados en el permeado de la leche humana HM-7 en el resto de muestras de leches humanas hidrolizadas. Para ello se utilizaron los análisis por RP-HPLC-MS/MS de los permeados de estas muestras y se realizó la extracción de los iones característicos correspondientes a cada péptido. Todos los péptidos identificados en la **Tabla 20** pudieron detectarse en los permeados de todas las leches humanas analizadas. Estos resultados muestran que el periodo de lactación no parece influir en el perfil peptídico obtenido tras la hidrólisis con pepsina y

pancreatina. Por consiguiente, la hidrólisis gastrointestinal de la leche humana HM-7 hidrolizada podría considerarse representativa de la hidrólisis gastrointestinal de leche humana y se utilizó para realizar los siguientes estudios sobre las actividades biológicas.

Tabla 20. Péptidos identificados por RP-HPLC-MS/MS en el permeado obtenido por ultrafiltración de la leche humana HM-7 hidrolizada con pepsina y pancreatina.

Pico N ^o ^a	Masa Experimental (Da)	Masa Calculada (Da)	Fragmento	Secuencia
1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
2	630,4	630,37	β -CN f(19-23)	QKVEK
3	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
4	654,4	654,37	β -CN f(155-160)	SVPQPK
	542,3	542,31	β -CN f(85-89)	EVPKA
5	479,3	479,25	β -CN f(206-209)	HNPI
6	595,3	595,33	β -CN f(68-73)	PLAQPA
7	384,2	384,24	β -CN f(175-178)	AVPV
8	602,4	602,31	β -CN f(84-88)	MEVPK
9	556,3	556,32	β -CN f(188-192)	LLNPT
10	444,2	444,24	β -CN f(99-102)	VMPV
11	575,3	575,34	β -CN f(125-129)	HLPLP
12	829,4	829,43	β -CN f(167-173)	QVVPYPQ
13	755,4	755,40	β -CN f(193-198)	HQIYPV
14	503,2	503,24	β -CN f(170-173)	PYPQ
15	840,4	840,45	β -CN f(154-160)	WSVPQPK
	600,4	600,38	α -La f(95-99)	ILDIK
16	665,4	665,41	β -CN f(161-166)	VLPIPQ
17	660,4	660,35	β -CN f(105-110)	SPTIPF
18	538,2	538,28	β -CN f(50-53)	IYPF
19	901,5	901,53	β -CN f(103-110)	LKSPTIPF
20	568,3	568,36	β -CN f(65-69)	NILPL
21	1089,5	1089,64	β -CN f(74-83)	VVLPVPQPEI
22	688,4	688,43	β -CN f(125-130)	HLPLPL
23	768,5	768,44	α -La f(19-26)	GGIALPEL

Número correspondiente al pico de la **Figura 31A**

^b n. i., no identificado

Actividades biológicas de los péptidos sintéticos

Se calculó la actividad IECA del extracto soluble en agua y del permeado obtenido mediante ultrafiltración de la leche HM-7 hidrolizada y se expresó mediante el valor del IC_{50} obteniéndose un valor de IC_{50} de 276,2 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto soluble en agua y de 240,1 $\mu\text{g/mL}$ para el permeado, respectivamente (en la **Tabla 22** se muestra el valor de IC_{50} del permeado). Cabe destacar, que el permeado exhibía una actividad muy parecida al extracto soluble en agua total.

La actividad antioxidante del permeado se determinó por con el ensayo del radical catiónico ABTS⁺. Este método permite calcular la actividad neutralizadora de un radical libre previamente formado comparándolo con una sustancia estándar antioxidante. El valor del TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) obtenido es de 0,47 μmol equivalentes Trolox/ μg proteína (**Tabla 22**).

Atendiendo a su secuencia de aminoácidos, 11 de los 23 péptidos identificados en el permeado fueron sintetizados químicamente. Estos péptidos se seleccionaron atendiendo a una serie de requisitos estructurales, tales como la hidrofobicidad del tripéptido del extremo C-terminal que es importante para la actividad IECA (Cheung y col., 1980) y la presencia de Trp y Tyr que son dos aminoácidos importantes para la actividad antioxidante (Hernández-Ledesma y col., 2005). La actividad IECA y antioxidante de los péptidos sintéticos se muestra en la **Tabla 21**. Sólo 4 de los péptidos sintetizados mostró actividad IECA con valores de IC_{50} menores a 420 μM . El fragmento 125-129 de la β -caseína, que correspondía a la secuencia HLPLP, fue el péptido que presentó una actividad IECA más potente con un valor de IC_{50} de 21 μM . Cada vez existen más evidencias de la influencia que tiene la alimentación con leche materna en los niveles de presión sanguínea durante la infancia y en la edad adulta (Martín y col., 2004, 2005; Wilson y col., 1998; Singhal A y col., 2001 Lancet). Para explicar este efecto se han propuesto distintos mecanismos, incluyendo una reducción en la ingesta de sodio, el aumento de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y la protección frente a la hiperinsulinemia en edades tempranas (Hofman y col., 1983; Forsyth y col., 2003; Lucas y col., 1983). Los resultados aquí presentados demuestran que el péptido HLPLP se produce en condiciones de simulación

gastrointestinal de la leche humana. Este péptido presenta actividad IECA y su efecto antihipertensivo *in vivo* se ha comprobado mediante experimentos llevados a cabo con SHR por el grupo de la Dra. Aleixandre en el Instituto de Farmacología y Toxicología del CSIC. El hecho de que recientemente el HLPLP se haya podido detectar en plasma humano (Van Platerink y col., 2006), junto con los resultados obtenidos en esta tesis que muestran que existe un flujo transepital del péptido mediado por difusión paracelular, podría indicar una posible función *in vivo* de esta secuencia para el tratamiento o la prevención de la hipertensión. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para poder determinar si realmente el péptido HLPLP es responsable en parte de los beneficios que se han documentado sobre el papel que ejerce la alimentación con leche materna en la reducción de la presión arterial. Asimismo, cabe destacar que este fragmento podría ser la forma activa del péptido LHLPLP producido mediante fermentación con distintas cepas de *E. faecalis* y que presenta efecto antihipertensivo en SHR (Quirós y col., 2006).

Con respecto a la actividad antioxidante, uno de los 11 péptidos sintetizados con secuencia WSVPQPK mostró una importante actividad neutralizante del radical ABTS⁺ (valor del TEAC 1,297 μmol equivalentes de Trolox/ μmol de péptido, **Tabla 21**). De los péptidos identificados en el permeado de la leche humana sólo 4 contenían Tyr en su secuencia y presentaban una actividad antioxidante moderada, con valores de TEAC comprendidos entre 0,309 y 0,931 μmol equivalentes de Trolox/ μmol de péptido. La presencia de los aminoácidos Tyr y Trp podría ser la causa de esta actividad. Trabajos previos (Dávalos y col., 2004; Hernández-Ledesma y col., 2005), y algunos resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio con péptidos sintéticos muestran la capacidad del grupo fenol e indol del Trp y la Tyr como donadores de hidrógeno siendo así responsables de la actividad neutralizante de radicales libres que muestran estos aminoácidos.

Tabla 21. Actividad IECA (expresada como IC₅₀) y actividad neutralizante del radical ABTS^a (expresada con el valor TEAC^b) de los péptidos sintéticos.

Fragmento	Secuencia	IC ₅₀ ^c (μM)	IC ₅₀ ^c (μg/mL)	Valor del TEAC (μmol equiv. Trolox/μmol peptido)
β-CN f(155-160)	SVPQPK	> 1000	> 655,0	< 0,1
β-CN f(85-89)	EVPKA	324,77	176,13	< 0,1
β-CN f(68-73)	PLAQPA	940,0	559,61	< 0,1
β-CN f(188-192)	LLNPT	> 1000	> 557,0	< 0,1
β-CN f(125-129)	HLPLP	21	12,08	< 0,1
β-CN f(167-173)	QVVPYPQ	> 1000	> 830,0	0,931
β-CN f(193-198)	HQIYPV	414,0	312,74	0,416
β-CN f(170-173)	PYPQ	> 1000	> 504,0	0,323
β-CN f(154-160)	WSVPQPK	667,96	561,39	1,297
β-CN f(161-166)	VLPIPQ	> 1000	> 666,0	< 0,1
β-CN f(50-53)	IYPF	> 1000	> 539,0	0,309

^a Sal diamónica 2,2'-azinobis [ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic]

^b Capacidad antioxidante equivalente al Trolox.

^c Concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA.

Identificación de péptidos procedentes de fórmulas infantiles hidrolizadas con pepsina y pancreatina

Tras la hidrólisis de las fórmulas infantiles con pepsina y pancreatina se obtuvieron los permeados de las fórmulas infantiles hidrolizadas mediante ultrafiltración a través de una membrana de 3000 Da y se determinó su actividad IECA y neutralizadora del radical ABTS⁺. La concentración de proteína y los valores de IC₅₀ y de TEAC de los permeados procedentes de la ultrafiltración de las fórmulas infantiles y de la leche humana hidrolizada se encuentran reflejados en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Concentración de proteína, actividad IECA (expresada como IC₅₀) y actividad neutralizadora del radical ABTS^a (expresada con el valor del TEAC^b) del permeado obtenido por ultrafiltración de la leche humana HM-7 y de las fórmulas infantiles después de la digestión con pepsina y pancreatina.

Muestra	Proteína (mg/mL)	IC ₅₀ ^c (μg proteína/mL)	TEAC (μmol Trolox equivs/μmol peptide)
HM-7	4,229	240,10	0,465
IF-1	7,069	93,05	0,297
IF-2	8,106	40,35	0,198
IF-3	5,026	114,23	0,293
IF-4	3,933	122,03	0,693
IF-5	5,727	60,11	1,706
IF-6	3,358	198,11	0,351
IF-7	5,487	109,96	0,315
IF-8	3,604	184,61	0,671

^a Sal diamónica 2,2'-azinobis [ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic]

^b Capacidad antioxidante equivalente al Trolox.

^c Concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA.

El contenido en proteína de las fórmulas infantiles reconstituidas se encontraba entre 3,358 y 8,106 mg/mL y los valores del IC₅₀ estaban comprendido entre 40,35 y 198,11 μg proteína/mL. A pesar de que el contenido en proteína del permeado de la leche humana hidrolizada (4,229 mg/mL) era similar al determinado en el permeado de las fórmulas infantiles hidrolizadas, el valor de IC₅₀ del permeado de la leche humana fue ligeramente superior (IC₅₀ 240 μg proteína/mL). La mayor actividad IECA se

encontró en las fórmulas infantiles hidrolizadas IF-1 y IF-5, con valores de IC₅₀ de 40,35 y 60,11 µg proteína/mL respectivamente. Estas muestras corresponden a fórmulas infantiles preparadas con proteínas de leche hidrolizadas. Los valores de IC₅₀ obtenidos muestran que estas fórmulas podrían ser por tanto una buena fuente de péptidos con actividad IECA.

Con respecto a la actividad antioxidante, la mayoría de las fórmulas analizadas mostró una baja o moderada actividad neutralizante de radicales, con valores de TEAC comprendidos entre 0,198 y 0,693 µmol equivalentes de Trolox/mg de proteína (**Tabla 22**). Esta actividad fue similar a la encontrada en la leche humana digerida (0,47 µmol equivalentes de Trolox/mg de proteína). Solamente el permeado de la fórmula infantil hidrolizada IF-5 mostró una potente actividad neutralizadora del radical ABTS⁺ (valor de TEAC 1,706 µmol equivalentes de Trolox/mg de proteína). La muestra IF-5 hidrolizada presentó una alta capacidad IECA y antioxidante por lo que fue elegida para llevar a cabo la identificación de los péptidos contenidos en el permeado procedente de la ultrafiltración. Se consideraron un total de 26 picos y se pudieron identificar 25 fragmentos, de los cuales 8 pertenecían a la β-caseína, 8 a la α_{s1}-caseína, 4 a la κ-caseína y 4 a la β-lactoglobulina (**Tabla 23**). Cuatro de las masas detectadas por masas y sus correspondientes espectros de fragmentación no pudieron asignarse a ningún péptido procedente de la hidrólisis de las proteínas lácteas. Sólo uno de los péptidos identificados en la fórmula infantil digerida IF-5 se detectó también en las leches humanas hidrolizadas con pepsina y pancreatina. Este péptido correspondía al fragmento 125-130 de la β-caseína humana y al fragmento 134-139 de la β-caseína bovina, y su secuencia era HLPLPL. Los resultados previamente obtenidos para el péptido LHLPLPL identificado en las leches fermentadas con *E. faecalis* mostraron que este péptido presentaba una actividad IECA 82 veces menor que el LHLPLP (Quirós y col., 2006). Por lo tanto, se estimó que el péptido HLPLPL podría exhibir una actividad IECA mucho menor que el péptido HLPLP y por esa razón no se incluyó en el grupo de péptidos a sintetizar. La concentración de los péptidos HLPLP y HLPLPL en la muestras hidrolizadas de leche humana y en la fórmula infantil IF-5 se estimó con el área del pico correspondiente a la extracción de los iones correspondientes a estos péptidos y mediante la utilización de una recta de calibración externa del péptido sintético HLPLP. En la leche humana hidrolizada, los péptidos HLPLP y HLPLPL

aparecieron en concentración similar, 10 y 9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mientras que la concentración del péptido HLPLPL en la fórmula infantil fue de 20 $\mu\text{g/mL}$ y no se detectó el péptido HLPLP. Los otros péptidos identificados en la fórmula infantil no fueron detectados en las muestras hidrolizadas de las leches humanas. Esto podría ser en parte debido a las diferencias en las secuencias aminoacídicas y a la diferente susceptibilidad a las enzimas de las proteínas lácteas humanas y bovinas.

Varios fragmentos identificados en el hidrolizado de la fórmula IF-5 (picos nº 11, 12, 17, 23 y 26, en la **Tabla 23**) eran muy similares o compartían similitud con péptidos encontrados por Hernández-Ledesma y col., (2004a) en el permeado obtenido por la ultrafiltración de varias fórmulas infantiles comerciales hidrolizadas con pepsina y Corolasa PP. Asimismo, algunos de los péptidos identificados habían sido descritos previamente como secuencias con actividad IECA y antioxidante. Como ejemplo, el fragmento 59-68 de la β -caseína, con secuencia VYFPFGPIPN (pico nº21, en la **Tabla 5**) ha sido descrito como un potente inhibidor de la ECA, con un valor de IC_{50} tan bajo como 14,8 μM (Saito y col., 2000). Además, este péptido comparte mucha similitud con la secuencia LVYPFTGPIPN que se ha identificado en kefir de leche de cabra y posee un IC_{50} de 27,9 μM . Otro péptido con secuencia GPFPIIV (pico nº 26 en la **Tabla 20**) corresponde al fragmento C-terminal de una secuencia con una potente actividad IECA (valor de IC_{50} 21 μM) que fue aislada de un hidrolizado de caseínas con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790 (Yamamoto y col., 1994). Seis de los 25 péptidos identificados contenían Tyr en su secuencia (ej. YYVPL y YFYPEL, Tabla 5) y probablemente estuvieran contribuyendo a la capacidad antioxidante tan alta encontrada en la fórmula infantil digerida.

Tabla 23. Péptidos identificados por RP-HPLC-MS/MS en el permeado obtenido mediante ultrafiltración de la fórmula infantil IF-5 después de la digestión con pepsina y pancreatina (n.i. no identificado, n. d. no documentado)

Nº.	Masa Pico	Masa Calc.	Fragmento	Secuencia	Péptidos inhibidores-ECA	IC ₅₀ ^a (µM)	Referencia
1	516,4	517,21	κ-CN f(2-5)	EQNQ			
2	493,3	493,30	α _{S1} -CN f(4-7)	HPIK			
3	645,4	645,32	β-CN f(100-105)	EAMAPK			
4	445,3	445,25	κ-CN f(162-165)	VQVT			
5	572,4	572,35	β-Lg f(71-75)	IIAEK			
6	633,4	633,35	α _{S1} -CN f(104-108)	YKVPQ	KKYKVPQ	716.9	Gómez-Ruiz et al., 2002
7	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.			
8	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.			
9	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.			
10	673,4	673,34	β-CN f(177-182)	AVPYPQ			
	562,2	562,28	β-Lg f(21-26)	SLAMAA			
11	655,4	655,37	κ-CN f(106-111)	MAIPPK			
12	627,4	627,40	β-Lg f(76-81)	TKIPAV			
13	747,4	747,36	β-CN f(108-113)	EMPFPK			
14	561,3	561,28	α _{S1} -CN f(194-198)	TTMPL			
15	804,4	804,44	β-Lg f(1-7)	LIVTQTM			
	596,4	597,29	κ-CN f(15-18)	ERFF			
16	386,2	386,22	α _{S1} -CN f(168-171)	PLGT			
17	750,4	750,36	β-CN f(114-119)	YPVEPF	MPFPKYPVQPF	n.r.	Saito et al., 2000
18	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.			
19	680,4	680,37	β-Lg f(142-147)	ALPMHI			
20	653,4	653,34	α _{S1} -CN f(165-169)	YYVPL	GAWYYVPL	>	Yamamoto et al., 1994
	551,2	551,37	β-CN f(135-139)	LPLPL		1000	
21	1099,5	1099,57	β-CN f(59-68)	VYFPFGPIPN	VYFPFGPIPN	14.8	Saito et al., 2000
22	830,4	830,39	α _{S1} -CN f(144-149)	YFYPEL			
23	688,5	688,43	β-CN f(134-139)	HLPLPL	HLPLP	23.6	Kohmura et al., 1989
24	904,5	904,47	α _{S1} -CN f(24-31)	FVAPFPEV			
25	961,4	961,49	α _{S1} -CN f(25-33)	VAPFPEVFG			
26	741,5	741,44	β-CN f(203-209)	GPFPIIV	LLYQQPVLGP- VRGPFPIIV	21	Yamamoto et al., 1994

Como conclusiones de este apartado podemos decir que el perfil peptídico que se obtuvo tras la hidrólisis con pepsina y pancreatina de las leches humanas y de las fórmulas infantiles fue bastante diferente. Si los péptidos procedentes de la digestión gastrointestinal de las proteínas alimentarias juegan un papel específico como reguladores metabólicos o fisiológicos, parece lógico que la actividad biológica que exhibe la leche humana y las fórmulas infantiles en el recién nacido sea diferente. Este trabajo es una primera aproximación al estudio de las actividades biológicas de la fracción peptídica obtenida por hidrólisis de la leche humana con pepsina y pancreatina, y se ha centrado en la actividad IECA y antioxidante. La fracción peptídica procedente de la leche humana mostró una moderada actividad IECA comparada con las actividades encontradas en el permeado de las fórmulas infantiles. De especial interés fue el fragmento 125-129 de la β -caseína, HLPLP, encontrado en las leches humanas hidrolizadas, que presenta una potente actividad IECA y antihipertensiva en SHR. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que este péptido puede absorberse en el tracto intestinal y que es resistente a las peptidasas sanguíneas, pudiendo ejercer así un posible efecto fisiológico. El fragmento β -caseína (154-160), WSVPQPK, hallado también en las leches humanas hidrolizadas, que mostró una potente actividad antioxidante. Sólo uno de los péptidos identificados en las leches humanas hidrolizadas, con secuencia HLPLPL, se detectó también en la fórmula infantil hidrolizada. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos con animales para poder concluir si alguna de estas secuencias tiene un papel fisiológico en la regulación de la presión sanguínea.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En kefir comercial de leche de cabra se han identificado dos nuevos péptidos, con secuencias PYVRYL y LVYPFTGPIPN, que presentan una potente actividad IECA con valores de IC₅₀ de 2,4 y 27,9 μM, respectivamente.

2. Las leches fermentadas con distintas cepas de *Enterococcus faecalis* poseen una alta capacidad IECA y antihipertensa.

3. Los péptidos responsables de la actividad IECA y antihipertensiva de las leches fermentadas con *Enterococcus faecalis* son principalmente el fragmento 133-138 (LHLPLP) y el fragmento 58-76 (LVYFPFGPIPNSLPQNIPP) de la β-caseína, los cuales presentan una alta actividad IECA con valores de IC₅₀ de 5,4 y 5,3 μM, respectivamente. Estos péptidos poseen además actividad antihipertensiva.

4. Se ha desarrollado un método rápido y robusto para cuantificar el péptido antihipertensivo LHLPLP por RP-HPLC-MS/MS en la fracción soluble de leches fermentadas. La concentración máxima de este péptido producida mediante la fermentación con las cepas de *E. faecalis* CECT 5727 y 5728 se alcanza a las 24 horas de fermentación y se encuentra entre 0,15 y 0,20 g/L.

5. De los péptidos identificados en la leche fermentada con *Enterococcus faecalis* CECT 5727, la secuencia LHLPLP fue resistente a las proteasas gastrointestinales. La secuencia LVYFPFGPIPNSLPQNIPP fue hidrolizada completamente por las enzimas digestivas y su actividad IECA disminuyó.

6. El péptido LHLPLP es hidrolizado por las peptidasas de las células epiteliales Caco-2 dando lugar al fragmento HLPLP el cual se transporta a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la difusión pasiva por vía paracelular el principal mecanismo de transporte de este péptido. La secuencia HLPLP presenta una actividad IECA muy potente y actividad antihipertensiva en animales, por lo que podría ser la forma activa en el organismo del péptido LHLPLP cuando se admistra a SHR.

7. El HLPLP es resistente a las peptidasas plasmáticas humanas durante 4 horas en las condiciones ensayadas. Sin embargo, ni el LHLPLP ni ninguno de sus fragmentos incluyendo el HLPLP se han podido encontrar en plasma de rata tras la administración del péptido.

8. El péptido LHLPLP se comporta como un verdadero inhibidor de la ECA y presenta un tipo de inhibición competitiva.

9. La sustitución de la Leu en penúltima posición por Gly, y la sustitución de Pro en la posición C-terminal por Arg, en la secuencia LHLPLP aumentó 2 y 5 veces la actividad IECA.

10. Se ha obtenido el péptido HLPLP mediante hidrólisis enzimática de un caseinato con Corolasa PP[®].

11. En muestras de leche humana sometidas a una simulación de la digestión gastrointestinal se han identificado el fragmento 125-129 de la β -caseína, HLPLP, que presenta una potente actividad IECA con un IC_{50} de 21 μ M y antihipertensiva en SHR, y el fragmento 154-160 de la β -caseína, WSVPQPK, que muestra una potente actividad antioxidante con un valor del TEAC de 1,23 μ mol equivalentes de Trolox/ μ mol de péptido.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, C. A., Baker, E., Sutherland, G. R. y Mccaughan, G. W. (1994). Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human cd26 (dipeptidyl peptidase-IV) gene. *Immunogenetics*, **40**, 331-338.
- Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferrenti, P. y Malorni, A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.*, **59**, 401-411.
- Alli, I., Okoniewska, M., Gibbs, B.F. y Konishi, Y. (1998). Identification of peptides in cheddar cheese by electrospray ionization mass spectrometry. *Int Dairy. J.*, **8**, 643-649.
- Alting, A.C., Meijer, R.J.G.M. y Van Beresteijn, E.C.H. (1997). Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. *Diabetes care*, **20** (5), 875-880.
- Angeletti, R., Gioacchini, A. M., Seraglia, R., Piro, R. y Traldi, P. (1998). The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the quality control of water buffalo mozzarella cheese. *J. Mass Spectrom.*, **33**, 525-531.
- Anonymous. (2005). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, **115**, 496-506.
- Arai, S. 1996. Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 9-15.
- Araujo, P., y Froyland, L. (2006). Optimisation of an extraction method for the determination of prostaglandin E-2 in plasma using experimental design and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, **830**, 212-217.
- Ashar, M. N. y Chang, R. (2004a). Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft.*, **59**, 363-366.

Ashar, M. N. y Chang, R. (2004b). Antihypertensive peptides purified from milks fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Milchwissenschaft.*, 14-17.

Ashar, M.N. y Chand, R. (2003). ACE-inhibitory activity of lactic acid bacteria in fermented milks. *Milchwissenschaft.*, **58**, 59-61.

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

Beshkova, D., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I. y Spasov, Z. N. (2002). Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.*, **19**, 537-544.

Biemann, K. (1992). Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 977-1010.

Bordenave, S., Sannier, F., Ricart, G. y Piot, J. M. (1999). Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: Generation of alpha-lactorphin. *Prep. Biochem. Biotech.*, **29**, 189-202.

Brandsch, M., Knütter, I. y Leibach, F. H. (2004). The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **21**, 53-60.

Brantl, V. (1984). Novel opioid peptides derived from human β -casein. *Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 213-214.

Breci, L. A., Tabb, D. L., Yates III, J. R. y Wysocki, V. H. (2003). Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Anal. Chem.*, **75**, 1963-1971.

Britton, J. R. y Kastin, A. J. (1991). Biologically-active polypeptides in milk. *Am. J. Med. Sci.*, **301**, 124-132.

Catinella, S., Traldi, P., Pinelli, C., Dallaturca, E. y Marsilio, R.. (1996a). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in milk science. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1629-1637.

Catinella, S., Traldi, P., Pinelli, C. y Dallaturca, E. (1996b). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: A valid analytical tool in the dairy industry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1123-1127.

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

Chang, B. W., Chen, R. L. C., Huang, I. J. y Chang, H. C. (2001). Assays for angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Anal. Biochem.*, **291**, 84-88.

Chatterton, D. E. W., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Sorensen, E. S., y Petersen, T. E. (2004). *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: research on biological functions. *Trends. Food Sci. Tech.*, **15**, 373-383.

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

Choi, H.S., Cho, H.Y., Yang, H.C., Ra, K. S. y Suh, H. J. (2001). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res. Int.*, **34** (2-3), 177-182.

Chtourou, A., Brignon, G. y Ribadeu-Dumas, B. (1985). Quantification of β -casein in human milk. *J. Dairy Res.*, **52**, 239-247.

Collins., R., Peto, R., MacMahon, S., Herbert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O. y Hennekens, C. H. (1990). Blood pressure, stroke, and

coronary Heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials and their epidemiological context. *The lancet*, **335**, 827-838.

Conradi, R. A., Wilkinson, K. F., Rush, B. D., Hilgers, A. R., Ruwart, M. J. y Burton, P. S. (1993). *In-vitro in-vivo* models for peptide oral absorption - comparison of Caco-2 cell-permeability with rat intestinal-absorption of renin inhibitory peptides. *Pharm. Res.*, **10**, 1790-1792.

Curtis, J. M., Dennis, D., Waddell, D. S., MacGillivray, T. y Ewart, H. S.. (2002). Determination of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide Leu-Lys-Pro-Asn-Met (LKPNM) in bonito muscle hydrolysates by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3919-3925.

Cushman, D. W. y Ondetti, M. A. (1991). History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, **17**, 589-592.

Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. y Ondetti, M. A. (1982). Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Cardiol.*, **49**, 1390-1394.

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

Cushman, D. W., Pluscec, J., Williams, N. J., Weaver, E. R., Sabo, E. F., Kocy, O., Cheung, H. S., y Ondetti, M. A. (1973). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops-jararaca* venom. *Experientia*, **29**, 1032-1035.

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

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., y López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Protect.*, **67**, 1939-1944.

Didelot, S., Bordenave-Juchereau, S., Rosenfeld, E., Fruitier-Arnaudin, I., Piot, J. M. y Sannier, F. (2006). Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *Int. Dairy J.*, **16**, 976-983.

Diplock, A. T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *Brit. J. Nutr.*, **81**, S1-S27.

Dong, C. y Ng-Kwai-Hang, K. F. (1998). Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of beta-casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis. *Int. Dairy J.*, **8**, 967-972.

D`Atri, F. y Citi, S. (2002). Molecular complexity of vertebrate tight junctions. *Mol. Memb. Biol.*, **19**, 103-112.

Esteban, L. (1993). Principio de Electrospray. En *La espectrometría de masas en imágenes*. Ed. ACK, D. L, Madrid, España, pp. 181.

Fanton, C., Delogu, G., Maccioni, E., Podda, G., Seraglia, R. y Traldi, P. (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the dairy industry 2. The protein fingerprint of ewe cheese and its application to detection of adulteration by bovine milk. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **12**, 1569-1573.

Farnworth, E. R. y Mainville, I. (2003). Kefir: A fermented milk product. Páginas 77-111 en *Handbook of Fermented Functional Foods*. E. R. Farnworth, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Fedele, L., Seraglia, R. y Battistotti, B. (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for monitoring bacterial protein digestion in yogur production. *J. Mass spectrom.*, **34**, 1338-1345.

Fei, Y.-J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. F. y Hediger, M. A. (1994). Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, **368**, 563-566.

Ferranti, P., Traisci, M. V., Picariello, G., Nasi, A., Boschi, V., Siervo, M., Falconi, C., Chianese, L., y Addeo, F. (2004). Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *J. Dairy Res.*, **71**, 74-87.

Ferreira, S. H., Bartelt D.C. y Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from bothrops-jararaca venom. *Biochem.*, **9**, 2583-2593.

Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C. B., y Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.*, **76**, 301-310.

Fitzgerald, R. J. y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.*, **59**, 118-125.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A. y Walsh D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *American Society for Nutritional Sciences*, supplement, 980S-988S.

FitzGerald, R. J. y Meisel, H. (1999). Lactokinins: whey protein derived ACE inhibitory peptides. *Nährung*, **43**, 165-167.

Flambard, B. (2004). Peptides with antihypertensive properties. *United States Patent No 20040106171*.

Flambard, B. (2005). Composition with heart rate-reducing properties. *United States Patent No 2005031602*.

Forsum, E. (1976). Determination of α -lactalbumin in human milk. *J. Dairy Sci.*, **59**, 14-18.

Forsyth, J. S., Willatts, P., Agostoni, C., Bissenden, J., Casaer, P. y Boehm, G. (2003). Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infant formula and blood pressure in later childhood. *Brit. Med. J.*, **326**, 953-955.

Foucaud, C., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Richard, J., Konings, W. N., Desmazeaud, M. y Poolman, B. (1995). Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.*, **177**, 4652-4657.

Fujita, H., Usui, H, Kurahashi, K. y Yoshikawa, M. (1995). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin b-1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, **16**,785-790.

Fujita, H., Yokoyama y K. Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Food Chem. Toxicol.*, **65** (4), 564-569.

Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson. D. y Nyborg, N. C.B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, **83**, 27-34.

Fuglsang, A., Nilsson, D. y Nyborg, N. C. B. (2002). Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl. Environ. Microb.*, **68**, 3566-3569.

Fulier, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365-378.

Gardner, M. L. G. (1984). Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet - a neglected field. *Biological reviews of the cambridge philosophical society*, **59**, 289-331.

Gobbetti, M., Minervini, F. y Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.*, **57**, 173-188.

Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.*, **42**, 223-239.

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

Gomez-Ruiz, J. A., Taborda, G., Amigo, L. Recio, I. y Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.*, **223**, 595-601.

Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004a). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1054**, 269-277.

Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I. y Belloque, J. (2004b). ACE-Inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [β -CN f(47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *J. Agric. Food chem.*, **52**, 6315-6319.

Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.*, **12**, 697-706.

Gouldsworthy, A. M. Leaver, J. y Banks, J. M. (1996). Application of a mass spectrometry for identifying peptides present in Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, **6**, 781-790.

Haileselassie, S.S., Lee, B. H. y Gibbs, B. F. (1999). Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J. Dairy Sci.*, **82**, 1612-1617.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767-771.

Hartrodt, B., Neubert, K., Fischer, G., Schulz, H. y Barth, A. (1982). Synthesis and enzymatic degradation of beta-casomorphine-5. *Pharmazie*, **37**, 165-169.

Hernandez, D., Cardell, E. y Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 77-84.

Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I. y Amigo, L. (2006). Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *J. Chromatography A.*, 1116,31-37.

Hernandez-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 1041-1048.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2004a). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion on infant formulas. *J. Agric. Chem.*, **14**, 889-898.

Hernandez-Ledesma, B., Amigo L., Ramos M. y Recio, I. (2004b). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agric. Chem.*, **52**, 1504-1510.

Hernandez-Ledesma, B., Amigo L., Ramos M. y Recio, I. (2004c). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A.*, **1049**, 107-114.

Hernandez-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. y Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine beta-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine beta-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.*, **12**, 805-812.

Hertzler, S. R., y Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.*, **103**, 582-587.

Hofman, A., Hazebroek, A. y Valkenburg, H.A. (1983). A randomized trial of sodium intake and blood pressure in newborn infants. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **250**, 370-373.

Holstege, D. M., Puschner, B., Whitehead, G. y Galey, F. D. (2002). Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 406-411.

Ijäs, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H. Y Nurminen, M. L. (2004). Antihypertensive opioid-like milk peptide α -lactorphin: lack effect on behavioural tests in mice. *Int. Dairy J.*, **14**, 201-205.

Jarrott, B., Drummer, O., Hooper, R., Anderson, A. I. E. Miach, P. J. y Louis, W. J. (1982). Pharmacokinetic properties of captopril after acute and chronic administration to hypertensive subjects. *Am. J. Cardiol.*, **49**, 1547-1549.

Jankowski, A., Skorek, A., Krzysko, K., Zarzycki, P. K., Ochocka, R. J y Lamparczyk, H. (1995). Captopril - determination in blood and pharmacokinetics after single oral dose. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **13**, 655-660.

Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. y Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative biochemistry and physiology c-pharmacology toxicology & endocrinology*, **96**, 367-371.

Kreil, G., Umbach, M, Brantl, V. y Teschemacher, H. (1983). Studies on the enzymatic degradation of beta-casomorphins. *Life Sci.*, **33**, 137-140 suppl. 1.

Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H. y Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.*, **83**, 255-263.

Kim, S. -K., Byun, H. -G., Park, P. -Y. y Fereidoon, S. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food chem.*, **49**, 2992-2997.

Kim, Y. K., Yoon, S., Yu, D. Y., Lonnerdal, B. y Chung, B. H. (1999). Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human alpha(s1)-casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, **66**, 431-439.

Kim, Y.S., Bertwhistle, W. y Kim, Y. W. (1972). Peptide hydrolyses in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. *J. Clin. Invest.*, **51**, 1419-1430.

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

Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, **16**, 945-960.

Kuwata, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Ushida, Y., Shimokawa, Y., Toida, T. y Hayasawa, H. (2001). Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J. Nutr.*, **131**, 2121-2127.

Lee, S.H. y Song, K. B. (2003). Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **68**, 2469-2472.

LeBlanc, A. D., Matar, C., LeBlanc, N. y Perdigon, G. (2005). Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Res.*, **7**, R477-R486.

LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J. C. Leblanc, J. y Perdigón, G. (2002). Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.*, **85**, 2733-2742.

Leclerc, P. L., Gauthier, S. F., Bachelard, H., Santure, M. y Roy, D. (2002). Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.*, **12**, 995-1004.

Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 67-78.

Li, G. –H., Liu, H., Shi, y. –H. y Le, G. –W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **37**, 219-224.

Lönnerdal, B. (2004). Human milk proteins. Key components for the biological activity of human milk. In Pickering, L. K., A. L. Morrow, G. M. Ruiz-Palacios, & R. J. Schanler (Eds.), *Protecting Infants through Human Milk: advancing the scientific evidence*. (pp. 11-26) New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Lopez-Fandino, R., Otte, J. y Van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.*, **16**, 1277-1293.

Lorenzen, P. C. y Meisel, H. (2005). Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *Int. J. Dairy Technol.*, **58**, 119-124.

Lucas, A., Blackburn, A. M, Aynsleygreen, A., Sarson, D. I., Adrian, T. E. y Bloom. S. R. (1980). Breast vs. bottle: endocrine responses are different with formula feeding. *Lancet*, **1**, 1267-1269.

Lv, G. S., Huo, G. C. y Fu, X. Y. (2003). Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, **86**, 1927-1931.

Maeno, M., Nakamura, Y., Mennear, J.H. y Bernard, B.K. (2005). Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): III. Single- and/or repeated-dose toxicity of tripeptides-containing *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powder and casein hydrolysate in rats. *Int. J. Toxicol.*, **24**, 13-23, Suppl. 4.

Maeno, M., Yamamoto, N. y Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, **79**, 1316-1321.

Manso, M. A. y Lopez-Fandino, R. (2003). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine kappa-casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *J. Food prot.*, **66**, 1686-1692.

Madara, J.L. y Stafford, J. (1989). Interferon- γ directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.*, **83**, 724-727.

Madara, J. L. (1983). Increases in guinea pig small intestinal transepithelial resistance induced by osmotic loads are accompanied by rapid alterations in absorptive-cell tight junction structure. *J. Cell Biol.*, **97**, 125-136.

Madara, J. L., Barenberg, D. y Carlson, S. (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J Cell Biol.*, **102**, 2125-2136.

Martin, R. M., Gunnell, D. y Smith, G. D. (2005). Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.*, **161**, 15-26.

Martin, R. M., Ness, A. R., Gunnell, D., Emmett, P. y Smith, G. D. (2004). Does breastfeeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). *Circulation*, **109**, 1259-1266.

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

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

Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein .2. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405-1409.

Maruyama, S. y Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the triptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**,1393-1394.

Massart, D.L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S.N., Michotte Y. y Kaufman, L. (1990). *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam.

Masuda, O., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, **126**, 3063-3068.

Matar, C. y Goulet, J. (1996). β -casomorphin 4 milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.*, **6**, 383-397.

Matsui, T., Imamura, M., Oka, H., Osajima, K., Kimoto, K.I., Kawasaki, T. y Matsumoto, K. (2004). Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J. Pept. Sci.*, **10**, 535-545.

Matsui, T., Yukiyoishi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. (2002a). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 80-86.

Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K. y Kawasaki, T. (2002b). Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin. Exp. Pharmacol. P.*, **29**, 204-208.

Matsui, T., Li, C-H., Tanaka, T., Maki, T., Osajima, Y. y Matsumoto, K. (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, **23** (4) 427-431.

Matsui, T., Matsufuji, H., Osajima, Y. (1992). Colorimetric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 517-518.

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

Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins

CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, 12, 1905-1919.

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

Meisel, H. (1993). Casokinins as inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. En *New Perspectives in infant nutrition*. Ed. G. Sawatzki y B. Renner, Thieme, Stuttgart, pp. 153-159.

Meredith, D. y Boyd, C. A. R. (1995). Oligopeptide transport by epithelial cells. *J. Membrane Biol.*, **145**, 1-12.

Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A. y Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.*, **89**, 3352-3359.

Miguel, M., Aleixandre, M. A., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2006). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 726-731.

Miguel, M., Muguerza, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M. y Aleixandre, A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br. J. Nutr.*, **94**, 36-43.

Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2004). Biological properties of peptides derived from egg white proteins. 1. Angiotensin I converting enzyme- inhibitory activity. *J. Food protect.*, **67**, 1914-1920.

Miller, J.N., y Miller, J.C. (2000). Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Pearson education, Harlow, England.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V., y Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed casein of milk from six species. *Appl. Environ. Microb.*, **69**, 5297-5305.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. y Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *App. Environ. Microbiol.*, **69**, 5297-5305.

Mitic, L. L., Van Itallie, C. M. y Anderso, J. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Tight junctions structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol.*, **279**, G250-G254.

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

Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T. y Yamamoto, N. (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J. Dairy Sci.*, **87**, 3183-3188.

Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y. y Yamamoto, N. (2005a). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br. J. Nutr.*, **94**, 84-91.

Mizuno, S., Mennear, J.H., Matsuura, K. y Bernard, B.K. (2005b). Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-iso-leucyl-L-prolyl-L-proline): V. A 13-week toxicity study of tripeptides-containing casein hydrolysate in male and female rats. *Int. J. Toxicol.*, **24**, 41-59, Suppl. 4.

Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Tochikubo, O. y Ueshima, H. (2004). Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am. J. Hypertens.*, **17**, 701-706.

Molle, D. y Leonil, J. (1995). Heterogeneity of the bovine kappa-casein caseinomacropptide, resolved by liquid-chromatography online with electrospray-ionization mass-spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **708**, 223-230.

Muguerza, B., Ramos, M., Sanchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A. y Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.*, **16** (1), 61-69.

Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1997). Angiotensin-I-Converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, **7**, 299-303.

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

Nakagomi, K., Fujimura, A., Ebisu, H., Sakai, T., Sadakane, Y., Fujii, N. y Tanimura, T. (1998). Acein-1, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide isolated from tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Lett.*, **438**, 255-257.

Nakamura, Y., Masuda, O. y Takano, T. (1996). Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 488-489.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., y Takano, T. (1995a). Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, **78**, 777-783.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, **78**, 1253-1257.

Nusrat, A., Turner, J. R. y Madara, J.L. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines and immune cells. *Am. J. Physiol.*, **279**, G851-G857.

Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Coronen, H. y Vapaatalo, H. (2000). α -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, **66**, 1535-1543.

Okano, T., Inui, K. I., Maegawa, H., Takano, M. y Hori, R. (1986). H⁺-Coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130-14134.

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

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

Oshima, G. y Nagasawa, K. (1979). Stereospecificity of peptidyl dipeptide hydrolase (angiotensin I-converting enzyme). *J. Biochem.*, **86**, 1719-1724.

Ou, B. X., Hampsch-Woodill, M. y Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (10), 4619-4626.

Pan, D., Luo, Y. K. y Tanokura, M. (2005). Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chem.*, **91**, 123-129.

Papayannopoulos, I. A. (1995). The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, **14**, 49-73.

Pappenheimer, J.R., Dahl, C. E., Karnovsky, M. L. y Maggio, J.E. (1994). Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D-amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **91**, 1942-1945.

Pins, J. J. y Keenan, J. M. (2003). The antihypertensive effects of a hydrolyzed whey protein isolate supplement (BioZate 1): A pilot study. *FASEB J.*, **17**, A1110-A1110, Part 2 Suppl. S.

Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 347-356.

Pihlanto-Leppala, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.*, **67**, 53-64.

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

Prupp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L. y Sorhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.*, **219**, 579-583.

Quirós, A., Ramos, M., Mugerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.*, **17**, 33-41.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.

Recio, I. y López-Fandiño, R. (2005). Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. En *Alimentos Funcionales* Ed. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.

Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., y Juillerat, M. A. (2004). Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6923-6931.

Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W. y Zaloga, G. P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, **60**, 332-337.

Rokka, T., Syvaaja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*, **52**, 675-678.

Roepstorff, P. y Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601.

Roufik, S., Gauthier, S. F. y Turgeon, S. L. (2006). *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine beta-lactoglobulin. *Int. Dairy J.*, **16** (4): 294-302.

Roy, M. K., Watanabe, Y. y Tamai, Y. (2000). Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting-enzyme activity. *Biotechn. Appl. Biochem.*, **31**, 95-100.

Rudloff, S. y Lonnerdal, B. (1992). Solubility and digestibility of milk-proteins in infant formulas exposed to different heat-treatments. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **15** (1), 25-33.

Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A. y Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.*, **11**, 441-447.

Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuda, S. I., Morimatsu, F. y Nishimura, T. (2006). Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 942-945.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. y Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, **83**, 1434-1440.

Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., Nakagawa, S., Kajimoto, Y. y Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J. Med. Food*, **8**, 423-430.

Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S. y Shimizu, M. (2002). Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **66**, 378-384.

Sato, K., Dohi, Y., Kojima, M., Miyagawa, K., Takase, H., Katada, E. y Suzuki, S. (2006). Effects of ascorbic acid on ambulatory blood pressure in elderly patients with refractory hypertension. *Arzneimittel-Forsch.*, **56**, 535-540.

Sentandreu, M. A., Toldra, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.*, **97**, 546-554.

Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T. y Korpela, R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, **57**, 124-127.

Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. y Korpela, R. A. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77**, 326-330.

Shalaby, S. M., Zakora, M. y Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J. Dairy Res.*, **73**, 178-186.

Shihabi, Z. K. (1999). Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, **853**, 185-188.

Shimizu., M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, **21**, 43-47.

Shimizu, M., Tsunogai ,M. y Arai,.S. (1997). Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides*, **18**, 681-687.

Scholtz-Ahrens, K. y Schrezenmeir, J (2000). Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.*, 84, Suppl. **1**, S147-S153.

Schonlein, C., Heins, J. y Barth, A. (1990). Purification and characterization of prolyl endopeptidase from pig brain. *Biological chemistry hoppe-seyler*, **371**, 1159-1164.

Silva, S. V. y Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.*, **15**, 1-15.

Singhal, A., Cole, T. J. y Lucas, A. (2001). Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet*, **357**, 413-419.

Sipola, M., Finckenberg, P., Vapaatalo, H., Pihlanto-Leppälä, A., Coronen, H., Korpela, R. y Nurminen, M. –L. (2002a). α -lactorphin and β -lactorphin improve arterial function in spontaneously rats. *Life Sciences*, **71**, 1245-1253.

Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H. y Nurminen, M. L. (2002b). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy res.*, **69**, 103-111.

Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H. y Nurminen, M.-L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, **52**, 745-54.

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

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

Stevens, R. L., Micalizzi, E. R., Fessler, D. C. y Pals, D. T. (1972). Angiotensin I converting enzyme of calf lung. Method of assay and partial purification. *Biochem.*, **11**, 2999-3007.

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

Takano, T. (1998). Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.*, **8**, 375-381.

Takayanagi, T. y Yokotsuka, K. (1999). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 65-68.

Tauzin, J., Miclo, L. y Gaillard, J. L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine alpha(S2)-casein. *FEBS Lett.*, **531**, 369-374.

Terada, T., Sawada, K., Saito, H., Hashimoto, Y. y Inui, K. I. (1999). Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol-Gastr. L.*, **276**, G1435-G1441.

Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress and redox signaling in hipertensión: what is the clinical significance? *Hypertension.*, **44**, 248-252.

Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M. L., Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L. y Nissinen, A. (2004). Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *J. Hum. Hypertens.*, **18**, 795-802.

Townsend, R. R., McFadden, C. B., Ford, V. y Cadee, J. A. (2004). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of casein protein hydrolysate (C12 peptide) in human essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **17**, 1056-1058.

Van Elswijk, D. A., Diefenbach, O., Van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R. y Van der Greef, J. (2003). Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1020**, 45-58.

Van Platerink, C. J., Janssen, H-G. M., Horsten, R. y Haverkamp, J. (2006). Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, **830**, 151-157.

Vermeirssen, V., Camp, J. V. y Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British J. Nutr.*, **92**, 357-366.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L. y Verstraete, W. (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *J. Dairy Sci.*, **86**, 429-438.

Vermeirssen, V., Camp, J. V. y Verstraete, W. (2002a). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys.*, **51**, 75-87.

Vermeirssen, V., Deplancke, B., Tappenden, K. A., Van Camp, J., Gaskins, H. R. y Verstraete, W. (2002b). Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *J. Pept. Sci.*, **8**, 95-100.

Visser, S., Slangen, C. J., Lagerwerf, F. M., Vandongen, W. D. y Haverkamp, J. (1995). Identification of a new genetic variant of bovine beta-casein using reversed-phase high-performance liquid-chromatography and mass-spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A.*, **711**, 141-150.

Visser, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor. An overview. *J. Dairy Sci.*, **76**, 329-350.

Visser, S., Slangen, C. J. y Rollema, H. S. (1991). Phenotyping of bovine-milk proteins by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.*, **548**, 361-370.

Vujcic, I. F., Vulic, M., y Könyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 847-850.

Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. A., MacDonald, J., Pentzien, A. K., Wright, G. A., Wal, J.M., Struthers, A.D., Meisel, H. y FitzGerald, R. J. (2004). *In vitro* generation and stability of the lactokinin beta-lactoglobulin fragment (142-148). *J. Dairy Sci.*, **87**, 3845-3857.

Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L. y Warhurst, G. (2005). Interferon- γ selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J. Cell. Sci.*, **118**, 5221-5230.

Wiles, P.G., Gray, I. K. y Kissling, R. C. (1998). Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: Review and interlaboratory study using dairy products. *J. AOAC Int.*, **81**, 620-632.

Wilson, A.C., Forsyth, J. S., Greene, S. A., Irvine, L., Hau, C. y Howie, P. W. (1998). Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *Brit. Med. J.*, **316**: 21-25

Wu, J. P., Aluko, R. E. y Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 732-738.

Wu, J. P. y Ding, X. L. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.*, **35**, 367-375.

Wung, J. y Ding, X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 501-506.

Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.*, **82**, 1388-1393.

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

Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1993). Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Biochem.*, **114**, 740-745.

Yang, C. Y., Dantzig, A. H. y Pidgeon, C. (1999). Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.*, **16**, 1331-1343.

Youakim, A. y Ahdieh, M. (1999). Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am. J. Physiol.*, **276**, G1279-G1288.

