



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición
y Seguridad Alimentaria

Utilización de proteasas de *Cynara scolymus* L. para
la obtención de péptidos bioactivos a partir de
ovoalbúmina, caseína y leche.

Autor:

Estefanía Bueno Gavilá

Directores:

Dr. D. Luis Tejada Portero
Dra. Dña. Adela Abellán Guillén

Murcia, Junio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición
y Seguridad Alimentaria

Utilización de proteasas de *Cynara scolymus* L. para
la obtención de péptidos bioactivos a partir de
ovoalbúmina, caseína y leche.

Autor:

Estefanía Bueno Gavilá

Directores:

Dr. D. Luis Tejada Portero
Dra. Dña. Adela Abellán Guillén

Murcia, Junio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Luis Tejada Portero y la Dra. Dña. Adela Abellán Guillén como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Utilización de proteasas de *Cynara scolymus* L. para la obtención de péptidos bioactivos a partir de ovoalbúmina, caseína y leche” realizada por Dña. Estefanía Bueno Gavilá en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 30 DE JUNIO DE 2017.

Dr. D. Luis Tejada Portero

Dra. Dña. Adela Abellán Guillén

A mis padres.
A Paco.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Dr. Luis Tejada Portero y la Dra. Adela Abellán Guillén, por haber puesto su confianza en mí para el desarrollo de este trabajo de investigación. Por su trabajo de guía y orientación e inestimable ayuda, esfuerzo y dedicación en el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia por la concesión de la beca-contrato predoctoral, la cual me ha abierto las puertas a la formación y el trabajo en Investigación y ha hecho posible la realización de esta tesis.

Al grupo de Investigación “Tecnología del procesado industrial y culinario de alimentos”. A José M^a, Eva, Pablo y Diego, por su colaboración, ayuda y apoyo.

A todo el personal del Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición por su acogida.

A la “Cátedra Internacional de Análisis Estadístico y Big Data”. A David y Luis Prieto, Carmen Carazo y Juanjo Piñero, por su amabilidad y ayuda en el procesamiento estadístico de los datos experimentales.

Al servicio de Proteómica y Bioinformática de la Universidad de Córdoba. A Carlos Fuentes y Fran Amil por su trabajo en la identificación y tratamiento de las secuencias peptídicas.

Al personal del Vicerrectorado de Investigación: Andrés, M^a Carmen, Silvia, Rosana, Ginés, Elena, Mariano, Miguel Ángel y resto de compañeros, por su dedicación y amabilidad.

A Gabi y José Manuel por su trabajo y ayuda en el laboratorio.

Gracias a Alfonso por su disponibilidad y ayuda con el HPLC.

A mis compañeros “de arriba” becarios post-doctorales, recientes doctores y doctorandos: Silvia, Vicente, Jose, Isa y Sara, por su calidad profesional y humana y por el buen ambiente reinante. También, a mis compañeros de fatigas en el laboratorio, Rebeca, Teresa y José Manuel, por estar siempre dispuestos a echar una mano y por las risas y buenos momentos compartidos.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres, por su amor infinito y por ayudarme y apoyarme siempre. También a mi hermano Esteban, a mis suegros Paco y Paqui, a mis cuñados Jesús y Cristina y a mi sobrino Rodriguito, por su cariño y apoyo.

Finalmente: gracias, Paco. Por tu gran ayuda a lo largo de la tesis, por tu paciencia y comprensión, por tener siempre una sonrisa, y por el amor que me demuestras todos los días. Contigo todo es fácil. No tengo palabras para agradecerte todo el bien y lo feliz que me haces y lo afortunada que me siento de tenerte en mi vida.

“Quienes no suelen realizar experimentos difícilmente pueden percatarse de la diversidad de circunstancias requeridas para que progresen hasta resultados perfectamente demostrativos; o de la frecuencia con la cual el hombre que persigue una meta en su profesión puede sufrir interrupciones que frustran su esfuerzo casi en el momento de alcanzar frutos: y sin embargo, no vacilo ni un momento...”

Edward Jenner, 1789.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	21
ÍNDICE DE FIGURAS	29
LISTA DE ABREVIATURAS	39
RESUMEN	43
ABSTRACT	45
I - INTRODUCCIÓN	49
I.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS	49
I.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN.	50
I.2.1. Hidrólisis enzimática	51
<i>I.2.1.1. Proteasas del cuajo animal</i>	<i>53</i>
<i>I.2.1.2. Proteasas del género Cynara</i>	<i>55</i>
I.2.2. Fermentación microbiana.....	58
I.2.3. Obtención de péptidos por síntesis.....	59
I.2.4. Aplicación de estrategias analíticas bioinformáticas y "omic" para la caracterización de péptidos bioactivos en alimentos	60
I.3. ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	65
I.3.1. Actividad antihipertensiva.	66
<i>I.3.1.1. Inhibidores competitivos.</i>	<i>69</i>
<i>I.3.1.2. Inhibidores no competitivos</i>	<i>71</i>
<i>I.3.1.3. Inhibidores acompetitivos.....</i>	<i>72</i>
I.3.2. Actividad antioxidante.	73
I.3.3. Actividad quelante de minerales.....	75
I.3.4. Actividad antimicrobiana	76
I.3.5. Actividad inmunomoduladora.....	80

I.3.6. Actividad opioide	80
I.3.7. Actividad hipocolesterolemiant	81
I.3.8. Actividad antitrombótica	82
I.3.9. Actividad citomoduladora	82
I.3.10. Actividad antigenotóxica	83
I.4. LA LECHE COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.	84
I.4.1. Características diferenciales de la leche de vaca y cabra	84
I.4.2. Efectos de la pasteurización	86
I.4.3. Efectos de la congelación	88
I.4.4. Proteólisis	89
<i>I.4.4.1. Digestión gastrointestinal in vivo</i>	90
<i>I.4.4.2. Fermentación microbiana in vitro</i>	90
I.4.5. Actividad de los péptidos derivados de la leche	91
<i>I.4.5.1. Péptidos antihipertensivos</i>	91
<i>I.4.5.2. Péptidos antioxidantes</i>	92
<i>I.4.5.3. Péptidos antimicrobianos</i>	92
<i>I.4.5.4. Péptidos inmunomoduladores</i>	93
<i>I.4.5.5. Péptidos opioides</i>	94
I.5. BIOPÉPTIDOS DERIVADOS DEL HUEVO	95
I.5.1. Actividad de los péptidos derivados del huevo	97
<i>I.5.1.1. Péptidos antihipertensivos.</i>	97
<i>I.5.1.2. Péptidos antioxidantes.</i>	97
<i>I.5.1.3. Péptidos antimicrobianos</i>	98
<i>I.5.1.4. Péptidos quelantes de minerales</i>	99
<i>I.5.1.5. Actividad antitumoral</i>	100
I.6. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ALCACHOFA	101
I.6.1. Aprovechamiento de subproductos de la alcachofa.	103
II - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	109

III - MATERIAL Y MÉTODOS	115
III.1. PROCEDIMIENTO GENERAL.....	115
III.2. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO.....	118
III.3. MATERIAL VEGETAL	119
III.4. EXTRACTO ENZIMÁTICO VEGETAL.....	119
III.4.1. Obtención del extracto.....	119
III.4.2. Determinación del contenido en proteína	120
III.4.3. Determinación de la actividad coagulante	121
III.4.4. Determinación de la actividad proteolítica	121
<i>III.4.4.1. Determinación de la actividad proteolítica sobre caseína bovina</i>	121
<i>III.4.4.2. Determinación de la actividad proteolítica sobre ovoalbúmina.</i>	122
III.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	122
III.5.1. Efecto de la temperatura, pH y concentración el extracto	122
<i>III.5.1.1. Caseína</i>	123
<i>III.5.1.2. Ovoalbúmina.....</i>	123
III.5.2. Estimación de $V_{\text{máx}}$ y K_M.....	124
<i>III.5.2.1. Caseína</i>	124
<i>III.5.2.2. Ovoalbúmina.....</i>	124
III.5.3. Cinética enzimática durante 24 horas.	125
<i>III.5.3.1. Caseína</i>	125
<i>III.5.3.2. Ovoalbúmina.....</i>	125
III.6. OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA BOVINA	125
III.7. OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE OVOALBÚMINA	126
III.8. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE LECHE ENTERA DE CABRA Y VACA.....	127
III.8.1. Obtención de la leche	127
<i>III.8.1.1. Recogida de la leche de cabra</i>	127

III.8.1.2. <i>Obtención de la leche de vaca comercial</i>	128
III.8.2. Tratamientos térmicos de la leche de cabra	128
III.8.2.1. <i>Leche cruda refrigerada</i>	128
III.8.2.2. <i>Leche tratada en condiciones de alta pasteurización</i>	128
III.8.2.3. <i>Leche congelada</i>	128
III.8.3. Determinación de la proteína de la leche	128
III.8.4. Determinación de la concentración del cuajo animal	129
III.8.5. Obtención de los hidrolizados de leche entera de vaca y cabra	130
III.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PEPTÍDICA DE LOS HIDROLIZADOS	131
III.9.1. Nitrógeno no proteico (NNP)	131
III.10. DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS HIDRÓFOS E HIDRÓFILOS	131
III.11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS HIDROLIZADOS	132
III.12. ACTIVIDAD IECA-I DE LOS HIDROLIZADOS	134
III.13. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS HIDROLIZADOS.....	136
III.13.1. Actividad antioxidante frente al radical DPPH	136
III.13.2. Actividad antioxidante frente al radical ABTS	138
III.13.3. Actividad quelante del hierro (II)	140
III.14. IDENTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....	141
III.14.1. Análisis de la bioactividad de los péptidos identificados	144
III.15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	144
IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
IV.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE <i>C. SCOLYMUS</i> L.: CONTENIDO EN PROTEÍNA Y ACTIVIDAD COAGULANTE	149
IV.1.1. Contenido en proteína del extracto soluble en agua de flor de <i>C. scolyms. L.</i>	149

IV.1.2. Actividad coagulante del extracto soluble en agua de flor de <i>C. scolymus</i> L. Comparación con la actividad coagulante del cuajo animal.	150
.....	
IV.1.2.1. <i>Actividad coagulante del extracto soluble en agua de flor de <i>C. scolymus</i> L.</i>	150
IV.1.2.2. <i>Actividad coagulante del cuajo animal comercial</i>	153
IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L. EN CASEÍNA BOVINA.	155
IV.2.1. Efecto de la temperatura.	155
IV.2.2. Efecto del pH	158
IV.2.3. Efecto de la concentración de extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.	160
IV.2.4. Efecto de la concentración de sustrato. Estimación de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M.	163
IV.2.5. Actividad enzimática durante 24 horas	166
IV.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L. EN OVOALBÚMINA.	168
IV.3.1. Efecto de la temperatura.	168
IV.3.1.1. <i>Efecto de la temperatura a la concentración de sustrato del 1%</i>	169
.....	
IV.3.1.2. <i>Efecto de la temperatura sobre la concentración de sustrato al 0,5%.</i>	171
IV.3.2. Efecto del pH	173
IV.3.3. Efecto de la concentración de proteína del extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.	176
IV.3.4. Efecto de la concentración de sustrato. Estimación de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M.	178
IV.3.5. Actividad enzimática durante 24 horas	181
IV.4. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE CASEÍNA BOVINA OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L.	183
IV.4.1. Concentración peptídica de los hidrolizados de caseína bovina.	183

IV.4.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de caseína bovina.	184
IV.4.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína bovina.	189
IV.4.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe²⁺ de los hidrolizados de caseína bovina.....	193
IV.4.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de caseína bovina.	200
IV.5. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE OVOALBÚMINA OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L.	204
IV.5.1. Concentración peptídica de los hidrolizados de ovoalbúmina.	204
IV.5.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de ovoalbúmina.	205
IV.5.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de ovoalbúmina.....	210
IV.5.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe²⁺ de los hidrolizados de ovoalbúmina.	213
IV.5.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de ovoalbúmina. ...	220
IV.6. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA Y OVOALBÚMINA ELABORADOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L.	223
IV.6.1. Comparación de la composición en NNP y perfil cromatográfico de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina.....	223
IV.6.2. Comparación de la actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina.	228
IV.6.3. Comparación de la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina	229
IV.6.4. Comparación de la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina.....	231
IV.7. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE LECHE DE VACA DE ALTA PASTEURIZACIÓN OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L. Y CUAJO ANIMAL.....	233
IV.7.1. Concentración en NNP de los hidrolizados de leche de vaca.	233

IV.7.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de leche de vaca.	235
IV.7.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca.	240
IV.7.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe ²⁺ de los hidrolizados de leche de vaca.....	242
IV.7.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de vaca. ...	249
IV.8. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE LECHE DE CABRA DE ALTA PASTEURIZACIÓN OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L. Y CUAJO ANIMAL.....	252
IV.8.1. Concentración de NNP de los hidrolizados de leche de cabra.	252
IV.8.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de leche de cabra	253
IV.8.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de cabra.	258
IV.8.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe ²⁺ de los hidrolizados de leche de cabra.....	261
IV.8.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de cabra. .	268
IV.9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS HIDROLIZADOS DE LECHE DE VACA Y CABRA PASTEURIZADOS OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L. Y CUAJO ANIMAL.....	270
IV.9.1. Comparación de la composición en NNP y perfil cromatográfico de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra y leche de vaca con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. y cuajo animal	270
IV.9.2. Comparación de la actividad IECA-I de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra y leche de vaca con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. y cuajo animal	275
IV.9.3. Comparación de la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra obtenidos con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. y cuajo animal.....	276

IV.9.4. Comparación de la actividad antimicrobiana de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra obtenidos con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. y cuajo animal.....	280
IV.10. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN Y CONGELACIÓN DE LA LECHE EN LOS HIDROLIZADOS DE LECHE DE CABRA ELABORADOS CON EXTRACTO DE FLOR DE <i>C. SCOLYMUS</i> L.	281
IV.10.1. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la composición en NNP y perfil cromatográfico de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.....	281
IV.10.2. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad IECA-I de la fracción <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de <i>C.scolymus</i> L.....	288
IV.10.3. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de la fracción <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.....	290
IV.10.4. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.	292
IV.11. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	294
IV.11.1. Péptidos bioactivos en hidrolizados de caseína.	294
IV.11.2. Péptidos bioactivos en hidrolizados de ovoalbúmina.	300
IV.11.3. Péptidos bioactivos en hidrolizados de leche de vaca.....	303
IV.11.4. Péptidos bioactivos en hidrolizados de leche de cabra.....	307
IV.11.5. Estudio comparativo de los péptidos identificados en los hidrolizados de caseína, ovoalbúmina, leche de vaca y leche de cabra.....	314
V - CONCLUSIONES	321
VI - BIBLIOGRAFÍA	327

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. 1. Composición (%) de la leche de vaca y la leche de cabra. (Adaptada de Sanz Ceballos <i>et al.</i> , 2009).....	85
Tabla I. 2. Composición en aminoácidos (mg/100g de leche) de la leche de cabra y la leche de vaca. (Adaptado de Sanz Ceballos <i>et al.</i> , 2009).....	86
Tabla I. 3. Péptidos bioactivos obtenidos de proteínas lácteas por fermentación (adaptado de Mohanty <i>et al.</i> , 2016).....	91
Tabla IV. 1. Contenido en proteína (media y desviación estándar) de los diferentes lotes del extracto de alcachofa obtenidos.....	149
Tabla IV. 2. Mejor ajuste para los modelos alternativos de tiempo de coagulación (t) como función de la concentración de proteína del extracto de alcachofa inicial (E_0) y sus coeficientes de determinación.....	151
Tabla IV. 3. Mejor ajuste para los modelos alternativos de tiempo de coagulación (t) como función de la concentración de cuajo animal comercial (E_0) y sus coeficientes de determinación.....	153
Tabla IV. 4. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de <i>C. scolymus</i> L. sobre la caseína a distintas temperaturas de ensayo.....	156
Tabla IV. 5. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de <i>C. scolymus</i> L. sobre la caseína a distintos pHs.....	159
Tabla IV. 6. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de <i>C. scolymus</i> L. sobre la caseína a distintas concentraciones de proteína del extracto.....	161
Tabla IV. 7. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de <i>C. scolymus</i> L. sobre la caseína a distintas concentraciones de sustrato.....	164

- Tabla IV. 8.** Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina al 1% a distintas temperaturas de ensayo..... 169
- Tabla IV. 9.** Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre ovoalbúmina al 0,5% a distintas temperaturas de ensayo..... 171
- Tabla IV. 10.** Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre ovoalbúmina a los distintos pHs ensayados. 174
- Tabla IV. 11.** Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a distintas concentraciones de proteína del extracto. 177
- Tabla IV. 12.** Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a distintas concentraciones de sustrato..... 179
- Tabla IV. 13.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y error estándar)..... 183
- Tabla IV. 14.** Efecto del tiempo de hidrólisis en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de caseína bovina, expresada en área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar)..... 184
- Tabla IV. 15.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA de los hidrolizados de caseína a la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Valores de medias y error estándar). 189
- Tabla IV. 16.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar). 193
- Tabla IV. 17.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS \bullet^+ de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar). 195
- Tabla IV. 18.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar). 197

Tabla IV. 19. TEAC de los hidrolizados totales de caseína bovina de flor de alcachofa frente a los radicales DPPH y ABTS. (Valores de medias y error estándar).....	199
Tabla IV. 20. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y error estándar).....	201
Tabla IV. 21. Efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	205
Tabla IV. 22. Efecto del tiempo de la hidrólisis en el la cantidad de péptidos de los hidrolizados de ovoalbúmina, expresada en área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).	206
Tabla IV. 23. Porcentaje de área cromatográfica correspondiente a péptidos hidrofóbicos sobre el área total de la muestra de los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L.	208
Tabla IV. 24. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA de los hidrolizados de ovoalbúmina a la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Valores de medias y error estándar).	210
Tabla IV. 25. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	214
Tabla IV. 26. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS \bullet^+ de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	216
Tabla IV. 27. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	218
Tabla IV. 28. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	221
Tabla IV. 29. Efecto del sustrato y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	223

Tabla IV. 30. Efecto del tipo de sustrato y el peso molecular en la concentración de péptidos totales, hidrofílicos e hidrofóbicos (u.a.c./ μg NNP) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).....	225
Tabla IV. 31. Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de caseína y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).	228
Tabla IV. 32. Efecto del sustrato enzimático y el peso molecular de los hidrolizados de ovoalbúmina y caseína en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH \bullet y ABTS \bullet^+ , y actividad quelante del Fe $^{2+}$. (Valores de medias y error estándar).	230
Tabla IV. 33. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).....	234
Tabla IV. 34. Efecto del tipo de enzima en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de leche de vaca expresada en unidades de área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).....	235
Tabla IV. 35. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).....	240
Tabla IV. 36. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).....	242
Tabla IV. 37. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca frente al radical ABTS \bullet^+ . (Valores de medias y error estándar).	245
Tabla IV. 38. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).	247
Tabla IV. 39. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de vaca con extracto de flor de <i>C. scolymsus</i> L. y cuajo animal. (Valores de medias y error estándar).	251

Tabla IV. 40. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).....	252
Tabla IV. 41. Efecto del tipo de enzima en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de leche de cabra expresada en unidades de área cromatográfica μg^{-1} de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).....	254
Tabla IV. 42. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).	259
Tabla IV. 43. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).	261
Tabla IV. 44. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra frente al radical ABTS ^{•+} . (Valores de medias y error estándar).	264
Tabla IV. 45. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).	266
Tabla IV. 46. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de <i>C. scolyimus</i> L. y cuajo animal. (Valores de medias y error estándar).	269
Tabla IV. 47. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la concentración de NNP (mg/mL), péptidos totales, hidrofílicos, hidrofóbicos y ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (u.a.c./ μg NNP) de las F<3kDa de los HLV e HLC.	271
Tabla IV. 48. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la concentración de péptidos totales, hidrofílicos e hidrofóbicos (u.a.c./ μg NNP) y ratio HO/HI de las F<3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra. (Valores de media y error estándar).....	272
Tabla IV. 49. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad IECA-I de las fracciones <3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).	275
Tabla IV. 50. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al DPPH [•] de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).....	277

- Tabla IV. 51.** Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al ABTS^{•+} de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar)..... 278
- Tabla IV. 52.** Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad quelante del hierro (II) de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar)..... 279
- Tabla IV. 53.** Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en la concentración de NNP (mg/mL), péptidos totales, hidrofílicos, hidrofóbicos y ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (u.a.c./μg NNP) de las fracciones <3kDa de los hidrolizados. (Valores de medias y error estándar)..... 282
- Tabla IV. 54.** Efecto del tipo de tratamiento térmico sobre la leche de cabra en la actividad IECA-I de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L. (Valores de medias y error estándar)..... 288
- Tabla IV. 55.** Efecto del tratamiento térmico de la leche de cabra en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH[•] y ABTS^{•+}, y actividad quelante del Fe²⁺ de las fracciones <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L. (Valores de medias y error estándar)..... 291
- Tabla IV. 56.** Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de cabra obtenidos a partir de leche sometida a distintos tratamientos térmicos. (Valores de medias y error estándar)..... 293
- Tabla IV. 57.** Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 2 horas..... 295
- Tabla IV. 58.** Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 4 horas..... 296
- Tabla IV. 59.** Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas..... 297
- Tabla IV. 60.** Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 2 horas..... 300

Tabla IV. 61. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 4 horas.	300
Tabla IV. 62. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	301
Tabla IV. 63. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de vaca pasteurizada comercial con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	304
Tabla IV. 64. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de vaca pasteurizada comercial con cuajo animal al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	305
Tabla IV. 65. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra pasteurizada con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	308
Tabla IV. 66. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal comercial al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	308
Tabla IV. 67. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra cruda refrigerada con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	311
Tabla IV. 68. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra congelada (-20°C durante 4 meses) con extracto de flor de <i>C. scolymus</i> L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.	311

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1. Principales procesos en la obtención de péptidos bioactivos (de Castro y Sato, 2015).....	50
Figura I. 2. Mecanismo de la reacción de las proteasas aspárticas. (Redibujado de Sinnot (1998) en Parkin, 2010).	54
Figura I. 3. Flores de <i>Cynara scolymus</i> L. (A) y <i>Cynara cardunculus</i> L. (B).	56
Figura I. 4. Diagrama de flujo del análisis de péptidos bioactivos de alimentos mostrando las estrategias integradas de producción y purificación para la caracterización funcional y estructural. (Adaptado de Saavedra <i>et al.</i> , 2013).	61
Figura I. 5. Modelos de la interacción entre el péptido inhibidor, con <i>trans</i> y <i>cis</i> -Pro en el extremo C-terminal (gris claro) y el sitio activo de la ECA-I (gris oscuro) (Gómez-Ruiz <i>et al.</i> , 2014)	64
Figura I. 6. Breve descripción del sistema renina-angiotensina, el principal sistema de regulación de la presión sanguínea y balance hídrico en el cuerpo humano (Mora <i>et al.</i> , 2016).....	68
Figura I. 7. Sitio activo de la ECA mostrando las interacciones entre los péptidos inhibidores de la ECA y la ECA (Hong <i>et al.</i> , 2008).....	71
Figura I. 8. Modelo de inhibición de la ECA por el péptido TPTQQS. El modelo muestra que el TPTQQS desplaza el ion zinc fuera del sitio activo para inhibir a la ECA (Ni <i>et al.</i> , 2012).	72
Figura I. 9. Producción y purificación de péptidos bioactivos de huevo (adaptado de Mine, 2007).....	96
Figura I. 10. Producción de alcachofa a nivel mundial (toneladas) en el año 2014. (Fuente: FAOStat, 2017a).....	101
Figura I. 11. Los diez principales productores de alcachofa a nivel mundial en el año 2014 (Fuente: FAOStat, 2017d).....	102

- Figura I. 12.** Diagrama de producción nacional a nivel de comunidades autónomas del año 2014. (Elaboración propia a partir del análisis provincial del MAPAMA del 2014)..... 103
- Figura III. 1.** Esquema de la obtención y caracterización del extracto de *C. scolymus* L., para los sustratos de caseína bovina y ovoalbúmina..... 115
- Figura III. 2.** Esquema del procedimiento experimental para los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina..... 116
- Figura III. 3.** Esquema del procedimiento experimental de los hidrolizados de leche..... 117
- Figura III. 4.** Recta patrón del método Bradford con seroalbúmina bovina (0'2-0'9 mg/mL)..... 120
- Figura III. 5.** Imagen del ensayo de la determinación de proteína: cubetas de espectrofotometría con las diluciones de la seroalbúmina bovina para la recta patrón y el reactivo de Bradford..... 121
- Figura III. 6.** Ejemplo del cálculo de la IC₅₀ de la ECA-I en una muestra de hidrolizado total de leche de cabra pasteurizada obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* L..... 136
- Figura III. 7.** Recta de la actividad captadora de radicales DPPH del Trolox (%) a distintas concentraciones (2-22 µM)..... 137
- Figura III. 8.** Imagen del ensayo de la actividad antioxidante frente al radical de ABTS: microplaca cargada con muestras de hidrolizados a diferentes diluciones y radical ABTS^{•+}..... 138
- Figura III. 9.** Ejemplo del cálculo de la IC₅₀ de captación del radical ABTS^{•+} en una muestra de hidrolizado total de leche de vaca pasteurizada obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* L..... 139
- Figura III. 10.** Recta de actividad captadora de radicales ABTS^{•+} del Trolox (%) a diferentes concentraciones (2-10 µM)..... 140
- Figura III. 11.** Ejemplo del cálculo de la IC₅₀ de la actividad quelante del Fe²⁺ en una muestra de la fracción <3kDa del hidrolizado leche de cabra cruda refrigerada obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* L..... 141

- Figura III. 12.** Imagen del ensayo de la actividad quelante del hierro (II): microplaca cargada con muestras de hidrolizados a distintas diluciones. 142
- Figura IV. 1.** Relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de proteína del extracto de flor de alcachofa. (A: modelo de Payens *et al.*; B: modelo Hooydonk y Walstra (1987); C: modelo de Kopelman y Cogan (1976); D: modelo de Hyslop *et al.* (1979))..... 152
- Figura IV. 2.** Relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de cuajo animal. A: modelo de Payens *et al.*; B: modelo Hooydonk y Walstra (1987); C: modelo de Kopelman y Cogan (1976); D: modelo de Hyslop *et al.* (1979). 154
- Figura IV. 3.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada una de las temperaturas ensayadas. 155
- Figura IV. 4.** Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolymsus* L. en la caseína bovina. 156
- Figura IV. 5.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada uno de los pHs ensayados..... 158
- Figura IV. 6.** Variación de la velocidad de proteólisis de la caseína por el extracto de flor de *C. scolymsus* L. en función del pH..... 159
- Figura IV. 7.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de proteína del extracto de *C. scolymsus* L. ensayadas..... 161
- Figura IV. 8.** Efecto de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymsus* L. en la velocidad de proteólisis de la caseína bovina..... 162
- Figura IV. 9.** Relación lineal de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymsus* L. en la velocidad de proteólisis de la caseína bovina..... 163
- Figura IV. 10.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción del extracto de flor de *C. scolymsus* L. sobre la caseína para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas..... 164
- Figura IV. 11.** Velocidad de la actividad proteolítica (v1:UAbs a 280 nm) del extracto de *C. scolymsus* L. a diferentes concentraciones de sustrato (v2: mg/mL). 165

- Figura IV. 12.** Variación de la concentración de péptidos solubles en agua por la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la caseína en función del tiempo de reacción. 166
- Figura IV. 13.** Variación de la velocidad de la actividad proteolítica de la caseína del extracto del flor de *C. scolymus* L. con el tiempo de reacción. 167
- Figura IV. 14.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) en función del tiempo de reacción para cada una de las temperaturas ensayadas. 169
- Figura IV. 15.** Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolymus* L. en la ovoalbúmina al 1%. 170
- Figura IV. 16.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción del extracto de alcachofa *C. scolymus* L. frente a la ovoalbúmina al 0,5%. 171
- Figura IV. 17.** Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolymus* L. en la ovoalbúmina..... 172
- Figura IV. 18.** Variación de la absorbancia (relacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de incubación del extracto de alcachofa *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a diferentes pHs..... 174
- Figura IV. 19.** Variación de la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina por el extracto de flor de *C. scolymus* L. en función del pH..... 175
- Figura IV. 20.** Variación de la absorbancia con el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de proteína del inóculo de extracto de *C. scolymus* L. (mg/mL) ensayadas..... 176
- Figura IV. 21.** Efecto de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymus* L. en la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina. 178
- Figura IV. 22.** Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) en función del tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de ovoalbúmina ensayadas. 179
- Figura IV. 23.** Velocidad de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. a diferentes concentraciones de sustrato. 180

- Figura IV. 24.** Variación de la concentración de péptidos solubles en agua por la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina en función del tiempo de reacción. 181
- Figura IV. 25.** Variación de la velocidad de la actividad proteolítica de la ovoalbúmina del extracto del flor de *C. scolymus* L. con el tiempo de reacción... 182
- Figura IV. 26.** Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína bovina obtenidos a partir de un extracto de flor de *C. scolymus* L. 188
- Figura IV. 27.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 190
- Figura IV. 28.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad antioxidante frente al DPPH, expresado en porcentaje y TEAC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 194
- Figura IV. 29.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS^{•+} de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 196
- Figura IV. 30.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 198
- Figura IV. 31.** Efecto de los hidrolizados de caseína sobre las curvas de crecimiento de *E. faecalis*. 202
- Figura IV. 32.** Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos a partir de un extracto de flor de *C. scolymus* L. 209
- Figura IV. 33.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 211
- Figura IV. 34.** Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad antioxidante frente al DPPH[•], expresado en porcentaje y TEAC.

(Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 215

Figura IV. 35. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del $ABTS^{\bullet+}$ de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 217

Figura IV. 36. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 219

Figura IV. 37. Efecto del sustrato y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 224

Figura IV. 38. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas de hidrólisis con extracto de flor de *C. scolymsus* L. 227

Figura IV. 39. Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tamaño molecular en la actividad IECA de hidrolizados de caseína y ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 229

Figura IV. 40. Efecto del sustrato enzimático y el peso molecular de los hidrolizados de ovoalbúmina y caseína en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH \bullet y $ABTS^{\bullet+}$, y actividad quelante del Fe^{2+} . (Valores de medias y barras de error estándar). 231

Figura IV. 41. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de leche de vaca preparados con proteasas de extracto de flor de alcachofa (HLV EA) y cuajo animal (HLV CA). 239

Figura IV. 42. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 241

Figura IV. 43. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de vaca. (Valores

- de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$). 243
- Figura IV. 44.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca frente al radical ABTS^{•+}. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 245
- Figura IV. 45.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 248
- Figura IV. 46.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)). 253
- Figura IV. 47.** Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de leche de cabra preparados con proteasas de extracto de flor de alcachofa (HLC EA) y cuajo animal (HLC CA). 257
- Figura IV. 48.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 260
- Figura IV. 49.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 262
- Figura IV. 50.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra frente al radical ABTS^{•+}. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 265
- Figura IV. 51.** Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 267

- Figura IV. 52.** Efecto del sustrato y el tipo de enzima en la concentración de NNP (mg/mL) de las F<3kDa del HLV e HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 271
- Figura IV. 53.** Perfiles cromatográficos a 214 nm de las F<3kDa de hidrolizados de leche de vaca y leche de cabra obtenidos con extracto de flor alcachofa (HLV EA y HLC EA) y con cuajo animal (HLV CA y HLC CA). 274
- Figura IV. 54.** Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tipo de enzima en la actividad IECA de hidrolizados de leche de vaca y cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 276
- Figura IV. 55.** Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al DPPH• de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 277
- Figura IV. 56.** Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al ABTS•+ de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 279
- Figura IV. 57.** Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad quelante del hierro (II) de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 280
- Figura IV. 58.** Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en la concentración de NNP (mg/mL) de la fracción <3kDa de los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 282
- Figura IV. 59.** Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en el ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos de la fracción <3kDa de los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 284

- Figura IV. 60.** Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas de hidrólisis con extracto de flor de *C. scolymus* L. 285
- Figura IV. 61.** Efecto del tipo de tratamiento térmico sobre la leche de cabra en la actividad IECA-I (%) de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 289
- Figura IV. 62.** Efecto del tratamiento térmico de la leche de cabra en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del Fe²⁺ de las fracciones <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)). 292
- Figura IV. 63.** Actividad potencial de los péptidos de los hidrolizados de caseína obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. de tiempo de hidrólisis de dos horas (CH2), de cuatro horas (CH4) y de dieciséis horas (CH16)..... 299
- Figura IV. 64.** Actividad potencial de los péptidos de los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. de tiempo de hidrólisis de dos horas (OH2), de cuatro horas (OH4) y de dieciséis horas (OH16)..... 302
- Figura IV. 65.** Actividad potencial de los péptidos de la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. (LCPBH) y con cuajo animal (LAPBH). 307
- Figura IV. 66.** Actividad potencial de los péptidos de la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. (LCPGH) y con cuajo animal (LAPGH)..... 310
- Figura IV. 67.** Actividad potencial de los péptidos de la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra cruda refrigerada (LCRGH) pasteurizada (LCPGH) y congelada (LCFGH) obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. 313
- Figura IV. 68.** Gráfico de intersecciones de los péptidos bioactivos identificados en los distintos hidrolizados..... 315
- Figura IV. 69.** Gráfico de intersecciones de los péptidos con fragmentos de secuencia con bioactividad identificados en los distintos hidrolizados..... 316
- Figura IV. 70.** Agrupación de las muestras según la bioactividad potencial de los péptidos presentes identificados..... 318

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Alanina	CRGH: Hidrolizado de leche de cabra cruda con extracto de alcachofa
AAPH: α,α' -Azodiisobutiroamidina dihidrocloruro	Cys: Cisteína
ABTS: Sal de diamonio 2,2-Azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	D: Ácido aspártico
Ala: Alanina	2D-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones
APBH: Hidrolizado de leche de vaca pasteurizada con cuajo animal	DDP-IV: Dipeptidil peptidasa IV
APGH: Hidrolizado de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal	DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
Arg: Arginina	E: Ácido glutámico
Asn: Asparagina	ECA: Enzima convertidora de angiotensina
Asp: Ácido aspártico	F: Fenilalanina
C: Cisteína	F<3kDa: fracción de peso molecular menor de 3kDa
CFGH: Hidrolizado de leche de cabra congelada con extracto de alcachofa	FAO: <i>Food and Agricultural Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
CH16: Hidrolizado total de caseína de dieciséis horas	FDA: <i>Food and Drug Administration</i> Administración de Alimentación y Fármacos (Estados Unidos)
CH2: Hidrolizado total de caseína de dos horas	G: Glicina
CH4: Hidrolizado total de caseína de cuatro horas	Gln: Glutamina
CN: caseína	Glu: Ácido glutámico
CPBH: Hidrolizado de leche de vaca pasteurizada con extracto de alcachofa	Gly: Glicina
CPGH: Hidrolizado de leche de cabra pasteurizada con extracto de alcachofa	GSH: Glutatión
	H: Histidina
	H16: Hidrolizado de dieciséis horas

H2: Hidrolizado de dos horas	α-La: α -lactoalbúmina
H4: Hidrolizado de cuatro horas	β-Lg: β -lactoglobulina
HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico	LAPBH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de vaca pasteurizada con cuajo animal
HHL: Hipuril-histidil-leucina	LAPGH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal
HI: Hidrofílico	LFCGH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de cabra congelada con extracto de flor de alcachofa
His: Histidina	LCH16: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de caseína de dieciséis horas
HLC CA: Hidrolizado de leche de cabra con cuajo animal	LCH2: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de caseína de dos horas
HLC EA: Hidrolizado de leche de cabra con extracto de alcachofa	LCH4: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de caseína de cuatro horas
HLC: Hidrolizado de leche de cabra	LC-MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas
HLV CA: Hidrolizado de leche de vaca con cuajo animal	LCPBH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de vaca pasteurizada con extracto de alcachofa
HLV EA: Hidrolizado de leche de vaca con extracto de alcachofa	LCPGH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de cabra pasteurizada con extracto de alcachofa
HLV: Hidrolizado de leche de vaca	LCRGH: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de leche de cabra cruda con extracto de alcachofa
HO: Hidrofóbico	LDL: <i>low density lipoproteins</i> (lipoproteínas de baja densidad)
HT: Hidrolizado total	Leu: Leucina
HTST: <i>high temperatura- short time</i> (alta temperatura a tiempo corto)	
I: Isoleucina	
IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%	
IDF: <i>International Dairy Federation</i> (Federación Internacional de Productos lácteos)	
IECA-I: inhibidor de la angiotensina I.	
Ile: Isoleucina	
K: Lisina	
L: Leucina	

LOH16: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de ovoalbúmina de dieciséis horas	OH4: Hidrolizado total de ovoalbúmina de cuatro horas
LOH2: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de ovoalbúmina de dos horas	p.a.: pureza analítica
LOH4: Fracción menor de 3kDa del hidrolizado de ovoalbúmina de cuatro horas	P: Prolina
Lys: Lisina	PCA: medio agar de contaje en placa
M: Metionina	Phe: Fenilalanina
MALDI-TOF-MS: Espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matri con detector de tiempo de vuelo	Pro: Prolina
Met: Metionina	PSM: <i>Peptide spectrum match</i> (Espectro que coincide con el péptido)
MM: Masa molecular	Q: Glutamina
MRM: Monitorización de múltiples reacciones	QSAR: <i>Quantitate structure-activity relationship</i> (Modelos de relación cuantitativa de estructura- actividad)
MS/MS: Espectrometría de masas en tándem	R: Arginina
MS: Espectrometría de masas	RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa
N: Asparagina	RSA: <i>Radical scavenging activity</i> (Actividad captadora de radical)
NALDI: Desorción/ionización láser asistido por nanoestructura	RSM: Metodología de superficie de respuestas
nLC-MS: Nanocromatografía líquida-espectrometría de masas	S: Serina
NNP: Nitrógeno no proteico	SA: ácido sinapínico
OH16: Hidrolizado total de ovoalbúmina de dieciséis horas	sECA: Enzima convertidora de angiotensina somática
OH2: Hidrolizado total de ovoalbúmina de dos horas	Ser: Serina
	T: Treonina
	TCA: ácido tricloroacético
	TEAC: <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> (Actividad antioxidante equivalente al trolox)

tECA: Enzima convertidora de
angiotensina testicular

TFA: ácido trifluoroacético

Thr: Treonina

Trp: Triptófano

TSB: caldo de cultivo de triptona soja

Tyr: Tirosina

u.a.c.: unidades de área cromatográfica

u.f.c.: unidades formadoras de colonias

UHT: *ultra-heat-treated* (tratado
temperatura ultra-alta)

V: Valina

Val: Valina

W: Triptófano

Y: Tirosina

RESUMEN

Recientemente, las proteínas alimentarias, además de por su papel nutricional básico en la dieta, han sido reconocidas como fuente de péptidos bioactivos. Dichos péptidos se encuentran encriptados dentro de la estructura primaria de la proteína y pueden ser liberados mediante hidrólisis enzimática. El creciente interés por el desarrollo de alimentos funcionales en beneficio de la salud del consumidor, ha hecho que en las últimas décadas haya aumentado la investigación en la obtención de péptidos bioactivos a partir de diferentes matrices proteicas y sus correspondientes métodos de producción. La utilización de proteasas aspárticas procedentes de los estigmas de las flores maduras de alcachofa para la obtención de enzimas en la producción de péptidos bioactivos, supondría el aprovechamiento de un residuo agrícola de una especie vegetal de gran importancia socio-económica a nivel regional.

En el trabajo desarrollado durante la presente tesis, se ha llevado a cabo la caracterización de la actividad enzimática de los extractos de flor de alcachofa para la producción de péptidos a partir de proteínas lácteas y ovoalbúmina. Por otro lado, se ha analizado la actividad *in vitro* inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina-I (IECA-I), antioxidante y antimicrobiana de hidrolizados peptídicos obtenidos a partir de caseína bovina, ovoalbúmina y leche entera de vaca y cabra. Por último, se ha llevado a cabo la identificación de los péptidos que han demostrado bioactividad presentes en los distintos hidrolizados.

Los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina contenían péptidos con actividad inhibidora de la ECA-I y actividad antioxidante *in vitro*, apreciándose la importancia de los péptidos de bajo peso molecular en la bioactividad observada y siendo el tiempo de hidrólisis un factor importante en la producción de dichos hidrolizados. Los hidrolizados de ovoalbúmina mostraron una mayor bioactividad respecto a los hidrolizados de caseína bovina.

Los hidrolizados de leche bovina y caprina obtenidos con extracto de flor de alcachofa mostraron mayor actividad *in vitro* que los obtenidos a partir de cuajo

animal. Los hidrolizados de leche de vaca obtenidos con extracto de flor de alcachofa, mostraron mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH y actividad quelante del hierro (II) que los hidrolizados de leche de cabra. Por otra parte, los tratamientos de pasteurización y congelación de la leche afectaron ligeramente en la bioactividad de los péptidos presentes en los hidrolizados obtenidos con el extracto de flor de alcachofa.

Durante la identificación por LC-MS de los péptidos presentes en los distintos hidrolizados, se han encontrado gran número de péptidos con secuencias cuya bioactividad ha sido demostrada en estudios previos.

Se ha constatado por tanto, que el extracto soluble en agua de flor de alcachofa es adecuado para la obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas de la leche y el huevo.

Palabras clave: Cynara, biopéptidos, caseína, ovoalbúmina, leche, antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana.

ABSTRACT

Recently, dietary proteins, in addition to their basic nutritional role in the diet, have been recognized as a source of bioactive peptides. Such peptides are encoded within the primary structure of the protein and can be released by enzymatic hydrolysis. The growing interest in the development of functional foods for the benefit of consumer health has led to the recent increase in research on the production of bioactive peptides from different protein matrices and production methods. The use of aspartic proteases from the stigmas of mature artichoke flowers to obtain hydrolytic enzymes in the production of bioactive peptides would involve the utilization of an agricultural residue of a plant species of great socio-economic importance at the regional level.

In the work developed during the thesis, the characterization of the enzymatic activity of artichoke flower extracts has been carried out for the production of peptides from dairy proteins and ovalbumin. On the other hand, the *in vitro* ACE inhibitory, antioxidant and antimicrobial activity of the peptidic hydrolysates obtained from bovine casein, ovalbumin and whole cow and goat milk were analyzed. Finally, the identification of the peptides that have demonstrated bioactivity present in the different hydrolysates has been carried out.

Bovine casein and ovalbumin hydrolysates contain peptides with ACE-I inhibitory and antioxidant activity *in vitro*. Within these results, low molecular weight peptides and the hydrolysis time were the most important factor in the production of such hydrolysates. Ovalbumin hydrolysates showed greater bioactivity with respect to bovine casein hydrolysates.

The hydrolysates of bovine and caprine milk obtained with artichoke flower extract showed higher *in vitro* activity than those obtained from animal rennet. The hydrolysates of cow's milk obtained with artichoke flower extract showed higher antioxidant activity against the DPPH radical and iron (II) chelating activity than the hydrolysates of goat milk. On the other hand, pasteurization and

freezing treatments of the milk slightly affected the bioactivity of the peptides present in the hydrolysates obtained with the artichoke flower extract.

In addition, during the LC-MS identification of the peptides present in the different hydrolysates, a large number of peptides have been found with sequences whose bioactivity has been demonstrated in previous studies.

It has been found, therefore, that the water-soluble extract of artichoke flower is suitable for the production of bioactive peptides from milk and egg proteins.

Key-words: Cynara, biopeptides, casein, ovalbumin, milk, antioxidant, antihypertensive, antimicrobial.

I - INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

I.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

La dieta es uno de los factores ambientales que influyen en nuestra salud y en el desarrollo de ciertas enfermedades. Las proteínas son un macronutriente fundamental de los alimentos, siendo fuente de aminoácidos esenciales, e indispensables para el crecimiento y mantenimiento del organismo. Además de su importancia nutricional, las proteínas contienen péptidos bioactivos que se encuentran encriptados dentro de su secuencia y pueden modular diferentes funciones corporales, como la digestiva y cardiovascular, así como actuar sobre los sistemas nervioso e inmune (Hafeez *et al.*, 2014).

Durante la digestión gastrointestinal las proteínas son hidrolizadas en una gran variedad de péptidos, algunos de los cuales comparten características estructurales con péptidos endógenos que actúan en el organismo como hormonas, neurotransmisores o péptidos reguladores. Los péptidos exógenos derivados de la dieta pueden interactuar con los mismos receptores en el organismo y ejercer una actividad agonista o antagonista (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014). Estos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína originaria y pueden ser liberados a través de diferentes procesos, como por ejemplo, la hidrólisis enzimática (Korhonen y Pihlanto, 2006).

De forma clásica, la calidad de las proteínas dietéticas está determinada por la composición de sus aminoácidos y la digestibilidad de la proteína (Leser, 2013). Sin embargo, otros parámetros, como la velocidad de digestión (Dangin *et al.*, 2002) o su potencial para liberar péptidos bioactivos (Kitts y Weiler, 2003) deberían tomarse en consideración para explicar completamente el valor biológico de las proteínas (Rémond *et al.*, 2016).

Debido a la mayor percepción del consumidor de la relación de alimentación y salud, ha aumentado su interés en la prevención de enfermedades y en mejorar su bienestar mediante el consumo de alimentos funcionales que pueden ejercer un efecto positivo en la salud estando presentes de forma normal en la dieta (Ruttarattanamongkol, 2012). Con el fin de explotar los prometedores

efectos positivos sobre la salud de los péptidos bioactivos para el desarrollo de alimentos funcionales, se han llevado a cabo muchos progresos elucidando la formación de los biopéptidos, y esclareciendo la relación estructura/ actividad, así como su biodisponibilidad (Hafeez *et al.*, 2014).

I.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN.

Los principales métodos de obtención de péptidos bioactivos a partir de sus proteínas precursoras son la hidrólisis enzimática, la fermentación microbiana y la proteólisis con enzimas microbianas (Figura I.1).

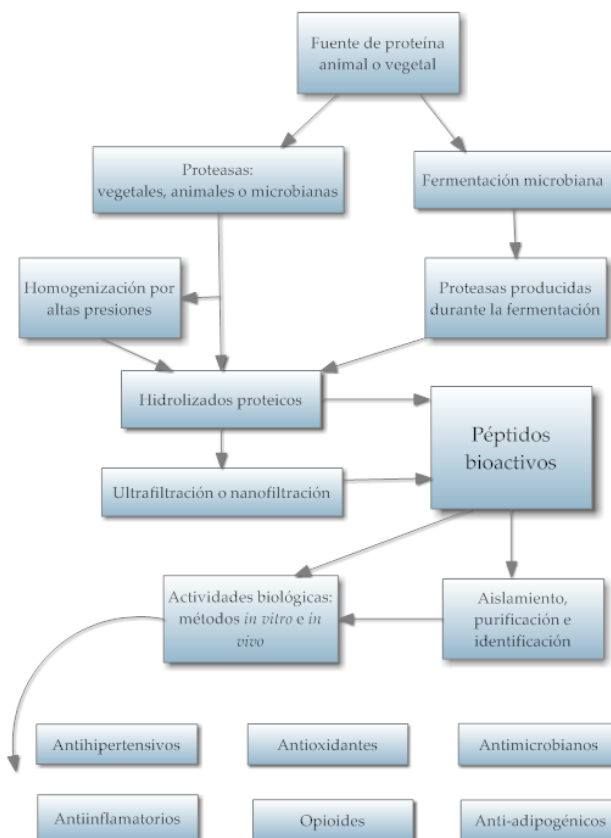


Figura I. 1. Principales procesos en la obtención de péptidos bioactivos (de Castro y Sato, 2015).

Asimismo, una vez conocida la secuencia del péptido y su estructura, también es posible su producción mediante síntesis química, tecnología de ADN recombinante y síntesis enzimática (Korhonen y Pihlanto, 2003).

Por otra parte, el análisis *in silico* (peptidómica) relacionado con la predicción de la actividad biológica de los péptidos, así como de la evaluación de las proteínas alimentarias como potenciales precursoras está cobrando una gran importancia en los últimos tiempos.

I.2.1. Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática es una de las técnicas más rápidas, seguras y fáciles de controlar para la producción de péptidos bioactivos y puede ser usada para mejorar las propiedades funcionales y biológicas de las proteínas, así como también para darle un valor añadido a los subproductos de bajo valor comercial (Luna-Vital *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014; Zarei *et al.*, 2014).

Este tipo de hidrólisis es la forma más habitual de obtención de péptidos bioactivos; de hecho, muchos de los péptidos conocidos actualmente han sido producidos utilizando enzimas digestivas (pepsina, tripsina, quimotripsina y pancreatina) u otras proteasas tanto solas como combinadas.

Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas y pueden actuar en los enlaces éster o en los enlaces amida. Todas las proteasas tienen un cierto grado de especificidad por el sustrato, generalmente basada en la secuencia de aminoácidos que rodean al enlace que va a ser escindido. La especificidad y las condiciones de hidrólisis (pH, temperatura y tiempo) afectan al tamaño y a las secuencias de los aminoácidos en las cadenas peptídicas así como a la cantidad de aminoácidos libres, lo que puede afectar a la actividad biológica de los hidrolizados (Luna-Vital *et al.*, 2015; Sarmadi e Ismail, 2010; Su *et al.*, 2011; Tsou *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013).

Las proteasas con alta especificidad, como la tripsina o la quimotripsina, y combinaciones de diferentes proteasas no específicas, tales como Pronase® E de *Streptomyces griseus* y Flavourzyme® de *A. oryzae*, se han utilizado para producir péptidos bioactivos más estables y efectivos, reduciéndose los tiempos de hidrólisis y haciendo posible la obtención de diferentes hidrolizados en la composición y la distribución de la masa molecular de los péptidos. Estos

procesos son especialmente utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica que utilizan proteasas de origen animal, vegetal y microbiano (de Castro *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014; Vanderghem *et al.*, 2011).

Los métodos hidrolíticos de obtención de péptidos más utilizados son la hidrólisis convencional por lotes y la hidrólisis en continuo con ultrafiltración por membrana. Diferentes estudios han demostrado que el método tradicional presenta una serie de desventajas, como el mayor costo o la menor eficiencia, en comparación con el método continuo (Chiang, *et al.*, 1995; Korhonen y Pihlanto, 2003; Mannheim y Cheryan, 1990). La configuración más interesante actualmente es el reactor con membrana enzimática, ya que combina hidrólisis enzimática, separación del producto y recuperación de los catalizadores en una sola operación; a esto se le suma, además, su aptitud para la hidrólisis simultánea de proteínas de diferentes orígenes con el fin de obtener hidrolizados con mejores características funcionales (Martin-Orue, *et al.* 1999; Perea y Ugalde, 1996).

Por su parte, los reactores con ultrafiltración por membrana presentan ciertas ventajas: una bioconversión más eficiente, un escalado fácil, y un producto final con mejores características de masa molecular, ya que la ultrafiltración permite separar los péptidos de peso molecular deseado (Mannheim y Cheryan, 1990). En esta línea se han desarrollado métodos de ultrafiltración doble para obtener mezclas peptídicas enriquecidas en péptidos de peso molecular por debajo de 2000 Da (Korhonen y Pihlanto, 2003; Turgeon y Gauthier, 1990).

Pepsina, tripsina y quimotripsina destacan como enzimas capaces de generar péptidos antihipertensivos, antibacterianos, inmunomoduladores, opioides, y fosfopéptidos quelantes de calcio a partir de diferentes caseínas (α y β caseínas así como el fragmento j-caseína) y proteínas del suero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y el glicomacropéptido) (FitzGerald *et al.*, 2004; Gobbetti *et al.*, 2004; Korhonen, 2009; Meisel y FitzGerald, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). Diferentes estudios han mostrado que la hidrólisis de la caseína genera péptidos con mayor capacidad inhibidora de la ECA que los obtenidos a partir de suero; no obstante, la digestión con tripsina de la β -lactoglobulina produce potentes péptidos antihipertensivos como el ALPMHIR (Ferreira *et al.*, 2007; Korhonen, 2009; Maes *et al.*, 2004; Mullally *et al.*, 1997b).

Por otra parte, las enzimas pancreáticas, se han utilizado para la obtención y caracterización de péptidos bioactivos, destacando la hidrólisis con tripsina que

rinde mayoritariamente péptidos con actividad inhibitoria de la ECA y fosfopéptidos quelantes de calcio (FitzGerald *et al.*, 2004; Gobetti *et al.*, 2004; Vermeirssen *et al.*, 2004). No obstante, las micelas de caseínas que han sido digeridas sucesivamente con pepsina y tripsina generan mayor cantidad de fosfopéptidos quelantes de calcio que cuando la digestión se hace con tripsina solamente (Ono *et al.*, 1998). Por otro lado, la hidrólisis con tripsina de α_2 -caseína bovina y de macropéptidos de κ -caseína tanto bovina como ovina, genera péptidos inhibidores de la ECA (Manso y López-Fandiño, 2003; Tauzin *et al.*, 2002).

Finalmente las proteasas alcalasa, termolisina y subtilisina generan péptidos inhibidores de la ECA, antioxidantes, antibacterianos, fosfopéptidos quelantes de calcio, péptidos inmunomoduladores y péptidos de tipo opioide (Gauthier *et al.*, 2006a, 2006b; Korhonen, 2009; López-Expósito y Recio, 2006; López-Expósito *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 2007; McDonagh y FitzGerald, 1998; Pihlanto, 2006; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000; Roufik *et al.*, 2006; Teschemacher, 2003; Vermeirssen *et al.*, 2004), destacando en este caso la capacidad de la termolisina de generar péptidos antihipertensivos no sólo a partir de proteínas lácteas sino también a partir de músculo esquelético porcino y proteínas del maíz (Arihara *et al.*, 2001; Korhonen y Pihlanto, 2003; Murakami y Hirata, 2000; Nakashima *et al.*, 2002).

1.2.1.1. Proteasas del cuajo animal:

El cuajo animal tradicionalmente se obtiene extrayendo el abomaso (cuarto estómago) de rumiantes jóvenes, principalmente terneros. El cuajo contiene quimosina y pepsina en proporción que depende de la edad del animal cuando es sacrificado y de su dieta previa. En productos comerciales, la cantidad de quimosina varía entre aproximadamente el 50% y el 95%.

La quimosina es conocida por su alta especificidad para escindir el caseinmacropéptido de la κ -caseína lo que desestabiliza las caseínas micelares e induce la coagulación de la leche (Hyslop, 2003; Crabbe, 2004), mientras que la pepsina es mucho menos específica e hidroliza enlaces con residuos de Phe, Tyr, Leu o Val (Agudelo *et al.*, 2004; Papoff *et al.*, 2004). Ambas enzimas son proteasas aspárticas (Chitpinityol y Crabbe, 1998).

Las proteasas aspárticas son endopeptidasas monoméricas activas a pH ácidos, entre 1-6, cuyo centro activo está formado por dos dominios proteicos

separados por una hendidura profunda (Whitaker *et al.*, 2003; Parkin, 2010). Dicho centro posee como unidad catalítica dos residuos Asp (Asp ácido y Asp carboxilato) altamente conservados que actúan como residuos ácido/base generales (Asp_{34,216} en la quimosina) en el mecanismo de hidrólisis junto con un intermediario no covalente (Sinnott, 1998) (Figura I.2).

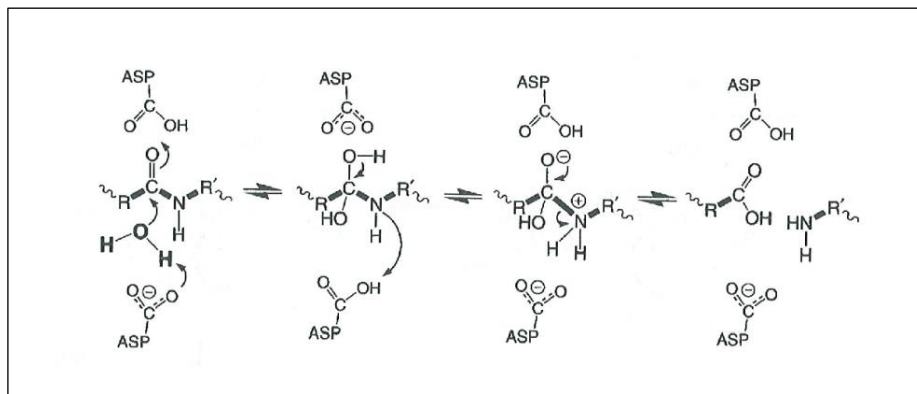


Figura I. 2. Mecanismo de la reacción de las proteasas aspárticas. (Redibujado de Sinnott (1998) en Parkin, 2010).

El grupo carbonilo del péptido se activa mediante un protón procedente del residuo Asp ácido; al mismo tiempo que el carboxilato del residuo Asp aumenta la nucleofilia del agua sustrayéndole un protón. Por otra parte, la regeneración de la enzima nativa se consigue mediante la pérdida del protón ganado por el residuo Asp carboxilato y la recuperación del protón perdido por el residuo Asp ácido. Este cambio además sirve previamente para la reorganización del intermedio tetrahédrico no covalente hidrato de amida, lo que le permite formar el zwitterión. Además de endopeptidasas, las proteasas aspárticas pueden intervenir en reacciones de transpeptidación cuyo mecanismo todavía se desconoce. Las diferentes proteasas aspárticas poseen una selectividad parecida ya que todas reconocen residuos no polares en el subsitio P1 del sustrato. (Parkin, 2010).

La quimosina de ternera se expresa en dos formas alélicas mayoritarias codificadas en un solo locus génico, las cuales difieren únicamente en un único aminoácido en la posición 254 (Asp en quimosina A y Gly en quimosina B (Donnelly *et al.*, 1984). La quimosina A, con una masa molecular de 35,71 kDa,

muestra mayor actividad enzimática que la quimosina B, con una masa molecular de 35,65 kDa, pero sufre degradación autocatalítica (Rampilli *et al.*, 1992; Lilla *et al.*, 2005). La quimosina C se consideró como un producto de la degradación de la quimosina A (Danley y Geoghegan 1988), pero se ha demostrado que esta forma es genéticamente distinta y es producto de un alelo diferente (Donnelly *et al.*, 1986; Rampilli *et al.*, 2005; Wislinski y Popielarz, 1994). La quimosina C muestra mayor actividad (aproximadamente un 20%) que la quimosina B, pero la variante C se encuentra en baja concentración en las mezclas de cuajo animal debido a la rareza del gen que la produce.

La pepsina está formada a partir de una reacción autocatalítica del pepsinógeno, que se encuentra en la mucosa gástrica de los animales. Se compone de una única cadena polipeptídica de 321 aminoácidos y tiene un peso molecular de 35 kDa. Su estructura terciaria está estabilizada en parte por tres puentes disulfuro y una unión fosfato; y el grupo fosfato está unido al grupo hidroxilo de un residuo serilo, que puede ser eliminado sin pérdida de la actividad enzimática (Naz, 2002).

1.2.1.2. *Proteasas del género Cynara:*

Cynara scolymus L. (alcachofa) es una planta ampliamente distribuida en las regiones mediterráneas, además de ser cultivada en Estados Unidos, Argentina y Nueva Zelanda. La flor inmadura constituye la parte comestible de la alcachofa y distintos órganos de la planta han sido utilizados en la medicina popular frente a dispepsias y desórdenes hepáticos. La alcachofa pertenece a la familia Asteraceae (Compositae), donde también está incluido el cardo (*Cynara cardunculus* L.) (Llorente *et al.*, 2004).

Las alcachofas son plantas perennes, sensibles a las heladas, con flores que brotan de la porción terminal del tallo principal y de los tallos laterales. Cada brote de flor sin abrir se asemeja a un cono de pino verde de 7-10 cm de diámetro, redondo, pero ligeramente alargado. Varias brácteas puntiagudas coriáceas de color verde se pliegan alrededor de una flor azul púrpura. La base de cada bráctea es la porción comestible carnosa junto con el centro carnoso de la alcachofa que sostiene a la flor y al conjunto de las brácteas (Sidrach *et al.*, 2005). El cardo es similar a la alcachofa pero es más robusto, tiene hojas más espinosas y no produce una flor comestible (Llorente *et al.*, 2004) (Figura I.3).

El extracto soluble en agua de la flor del cardo se ha usado durante siglos en la elaboración de quesos artesanales de leche de oveja o de cabra como el queso Serra da Estrela, Manchego, La Serena o Serpa en España y Portugal, algunos de ellos con denominación de origen protegida (Jacob *et al.*, 2011; Reis y Malcata, 2011; Silva y Malcata, 2005).

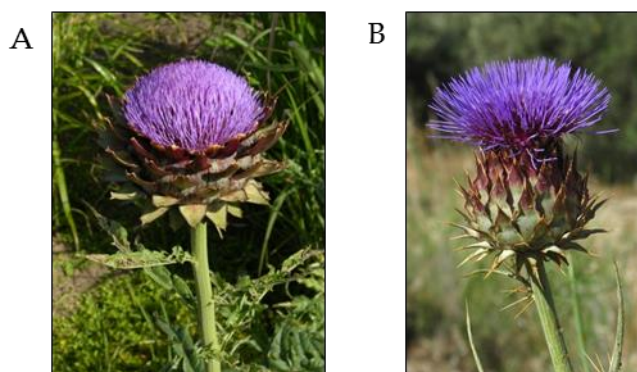


Figura I. 3. Flores de *Cynara scolymus* L. (A) y *Cynara cardunculus* L. (B).

Se han descrito dos grupos de proteasas aspárticas en el cardo: proteinasas aisladas de los estigmas en condiciones alcalinas llamadas “cinarasas” o “ciprosinas” (Cordeiro *et al.*, 1994a; Cordeiro *et al.*, 1994b; Heimgarter *et al.*, 1990; White *et al.*, 1999) y aquellas aisladas en medio ácido llamadas “cardosinas” (Faro *et al.*, 1999; Frazao *et al.*, 1999; Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Veríssimo *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2001)

Las cardosinas A y B, proteasas aspárticas principales responsables de la coagulación de la leche, han mostrado tener actividad sobre la κ -caseína de un modo similar al de la quimosina, escindiendo el enlace peptídico Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína bovina y ovina, mientras que en la κ -caseína caprina se unen preferentemente al enlace Lys₁₁₆-Thr₁₁₇ (Silva y Malcata, 2005). Estas dos enzimas pueden hidrolizar también la α - y la β -caseína, y en la producción de queso se obtiene una textura suave y cremosa, un aroma típico y un sabor ligeramente picante (Galán *et al.*, 2008).

Las proteasas aspárticas de la especie *C. cardunculus* están codificada por una familia multigénica (Pimentel *et al.*, 2007) y hasta la fecha nueve aspartato proteasas: las ciprosinas A, B y C, y las cardosinas A, B, E, F, G y H, han sido

aisladas, purificadas y caracterizadas bioquímicamente (Sarmiento *et al.*, 2009). Se sintetizan como zimógenos de cadena única con la subsiguiente conversión a su forma madura de doble cadena, siendo este paso crucial en la regulación de su actividad. Estas enzimas son proteasas aspárticas diméricas, glicosiladas, sensibles a la pepstatina y activas a pH ácido (pH óptimo 4.5), con especificidad por los enlaces peptídicos entre aminoácidos hidrofóbicos (Sampaio *et al.*, 2008; Sarmiento *et al.* 2009). Se han descrito también los genes de las cardosinas C y D, aunque las proteínas derivadas de éstos todavía no se han identificado (Pimentel *et al.*, 2007).

La intensidad de la hidrólisis de las caseínas por las proteasas aspárticas presentes en el extracto de flor de alcachofa es similar a la obtenida con extractos solubles en agua de los estigmas de la flor de *C. cardunculus* (Sidrach *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2002).

Así, los enlaces peptídicos que muestran mayor susceptibilidad relativa a la acción de las cardosinas en la α_s -caseína bovina son $\text{Phe}_{23}\text{-Phe}_{24} > \text{Trp}_{164}\text{-Tyr}_{165} > \text{Tyr}_{166}\text{-Val}_{167} > \text{Tyr}_{165}\text{-Tyr}_{166} > \text{Phe}_{153}\text{-Tyr}_{154} > \text{Phe}_{145}\text{-Tyr}_{146} \approx \text{Leu}_{149}\text{-Phe}_{150} \approx \text{Leu}_{156}\text{-Asp}_{157} \approx \text{Ala}_{163}\text{-Trp}_{164}$. En α_s -caseína las enzimas escinden los enlaces $\text{Phe}_{88}\text{-Tyr}_{89}$ y $\text{Tyr}_{95}\text{-Leu}_{96}$. En el caso de la β -caseína la susceptibilidad relativa de los enlaces peptídicos es $\text{Leu}_{192}\text{-Tyr}_{193} > \text{Leu}_{191}\text{-Leu}_{192} \approx \text{Leu}_{165}\text{-Ser}_{166} > \text{Phe}_{190}\text{-Leu}_{191} \geq \text{Ala}_{189}\text{-Phe}_{190} \approx \text{Leu}_{127}\text{-Thr}_{128}$ (Macedo *et al.*, 1996). Las enzimas presentes en el extracto de flor de *C. scolymus* mostraron especificidad por los enlaces $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$, $\text{Tyr}_{42}\text{-Tyr}_{43}$ y $\text{Leu}_{50}\text{-Ile}_{51}$ de la κ -caseína (Llorente *et al.*, 2014).

Las cardosinas muestran una preferencia clara por los enlaces entre aminoácidos hidrofóbicos grandes, escindiendo cuatro enlaces peptídicos consecutivos en regiones extremadamente hidrofóbicas de la α_{s1} -caseína ($\text{Ala}_{163}\text{-Val}_{167}$) y de la β -caseína ($\text{Ala}_{189}\text{-Tyr}_{193}$), los cuales son menos atacados por la quimosina en diferentes condiciones experimentales. El sitio activo de la cardosina acomoda secuencias tan grandes como Trp-Tyr-Tyr en diferentes subsitios (del S_1 al S'_2 , del S_2 al S'_1 , y probablemente del S_3 al S_1) (Llorente *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 1996).

En el caso de las caseínas caprinas, los mayores sitios de escisión por parte de las cardosinas son $\text{Phe}_{23}\text{-Val}_{24}$, $\text{Trp}_{164}\text{-Tyr}_{165}$ y $\text{Tyr}_{173}\text{-Thr}_{174}$ para la α_{s1} -caseína, $\text{Ser}_9\text{-Ser}_{10}$, $\text{Phe}_{88}\text{-Tyr}_{89}$ y $\text{Tyr}_{179}\text{-Leu}_{180}$ para la α_{s2} -caseína, $\text{Glu}_{100}\text{-Thr}_{101}$, Leu_{127} -

Thr₁₂₈, Leu₁₃₆-Pro₁₃₇ y Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ para la β -caseína, y Lys₁₁₆-Thr₁₁₇ para la κ -caseína (Sousa y Malcata, 1998).

I.2.2. Fermentación microbiana.

La naturaleza proteolítica de la mayoría de los cultivos lácticos comerciales hace esperar la formación de péptidos bioactivos durante la fermentación de productos lácteos; de hecho, se han identificado diferentes péptidos bioactivos producidos durante la fermentación microbiana de la leche usando tanto bacterias del yogurt como bacterias del queso o cultivos comerciales probióticos (Donkor *et al.*, 2007; Fitzgerald y Murray, 2006; Fuglsang *et al.*, 2003; Gobbetti *et al.*, 2004, 2007; Gómez-Ruiz *et al.*, 2002; Korhonen, 2009; Matar *et al.*, 2003).

Mediante fermentación microbiana también se ha conseguido producir péptidos inhibidores de la ECA (Korhonen y Pihlanto, 2003; Maeno *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1994), destacando dos péptidos generados por *Lactobacillus helveticus* (IPP y VPP), que han mostrado un potente efecto antihipertensivo en estudios con animales de laboratorio así como los identificados en la leche cruda fermentada con *Enterococcus faecalis* (Aihara *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 1996; Hirota *et al.*, 2007; Jauhiainen *et al.*, 2005; Korhonen, 2009; Masuda *et al.*, 1996; Mizushima *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 1995a, 1995b; Quirós *et al.*, 2007b; Seppo *et al.*, 2003; Sipola *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que el tratamiento con proteasas microbianas a leche que ha sido fermentada con cultivos lácticos aumenta su contenido en péptidos inhibitorios de la ECA (Chen *et al.*, 2007).

La carne también se ha utilizado como fuente de péptidos bioactivos; en particular péptidos antihipertensivos. Por ejemplo el dipéptido RP producido mediante dipeptidilpeptidasas (Jang y Lee, 2005), los péptidos MAPPL y ITTAP de músculo esquelético porcino producidos con termolisina (Arihara, 2004, 2006; Nakashima *et al.*, 2002), los péptidos de estructura G-X-X-G-X-X-G-X-X generados a partir de pechuga de pollo tratada tanto con proteasas gástricas como fúngicas obtenidas de *Aspergillus* (Saiga *et al.*, 2003), el péptido GAHGLHGP procedente de la hidrólisis con proteasas de *Aspergillus* de colágeno porcino (Saiga *et al.*, 2003), los péptidos obtenidos de hueso de pollo por hidrólisis con alcalasa (Cheng *et al.*, 2008), el péptido VLAGTL obtenido por hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas de vacuno (Jang y Lee, 2005), el péptido RMLGQTPT obtenido por hidrólisis

enzimática de la troponina C de músculo esquelético porcino (Katayama *et al.*, 2003) y los péptidos GPL y GPV procedentes de la digestión con alcalasa, pronasa E y colagenasa de la gelatina cutánea de bovino (Kim *et al.*, 2001) muestran una potente actividad inhibidora de la ECA.

En lo que se refiere a la actividad antioxidante, la hidrólisis de proteínas alimentarias también genera péptidos con dicha actividad que se están utilizando para evitar oxidaciones en productos cárnicos; por ejemplo los obtenidos de caseína hidrolizada con proteasas fúngicas (Sakanaka *et al.*, 2005) o con *Flavourzyme*[®] (Zhang *et al.*, 2010), o los procedentes de hidrolizados de proteína de patata (Wang y Xiong, 2008). De hecho, el uso de estos péptidos como sustitutos de los antioxidantes sintéticos está en alza debido a que no presentan los potenciales riesgos sobre la salud asociados a estos últimos (Becker, 1993; Mendis *et al.*, 2005a, 2005b).

I.2.3. Obtención de péptidos por síntesis.

La síntesis es el método de laboratorio más utilizado para la obtención de péptidos bioactivos, siendo la longitud del péptido y la cantidad los dos factores determinantes de la viabilidad del proceso (Dziuba y Dziuba, 2014; Narai-Kanayama *et al.*, 2010). La síntesis enzimática normalmente se utiliza para la obtención de péptidos de cadena corta, mientras que para los de cadena larga es preferible utilizar métodos de ADN recombinante si bien es cierto que a escala de laboratorio se suele optar por la síntesis química. Para esta última existen dos variantes: fase líquida o fase sólida, dónde la sólida es de las dos técnicas la más potente para la obtención de péptidos con un tamaño entre 10 y 100 aminoácidos en ensayos a pequeña escala o para la obtención de bibliotecas de péptidos (Gill *et al.*, 1996; Korhonen y Pihlanto, 2003).

En el caso de la síntesis mediante tecnología de ADN recombinante, ésta resulta muy barata en lo que se refiere a generación de producto porque utiliza materiales de partida poco costosos. Sin embargo, su implantación requiere de fases previas muy caras de investigación y desarrollo; de hecho, los intentos de obtención de péptidos de cadena corta mediante esta técnica no han dado los resultados adecuados. A día de hoy los resultados más prometedores se han

conseguido en la producción de β -casomorfina humana y bovina mediante *E. coli* recombinante (Folkers, 1994).

Por otra parte, se puede utilizar la ingeniería genética para producir enzimas con actividad proteolítica específica capaces de generar péptidos bioactivos de diferentes proteínas precursoras. No obstante, la producción de péptidos de cadena corta representa una limitación para esta tecnología dado que no se han conseguido ni los niveles de expresión deseados ni los rendimientos adecuados de extracción y purificación (Korhonen y Pihlanto, 2003).

I.2.4. Aplicación de estrategias analíticas bioinformáticas y "omic" para la caracterización de péptidos bioactivos en alimentos.

Varios aspectos son importantes en la determinación de la actividad biológica de los péptidos: la enzima utilizada en la hidrólisis, las condiciones del procesado del alimento y el tamaño de los péptidos resultantes. Todo ello repercute en la absorción a través de los enterocitos y biodisponibilidad en los tejidos diana (Udenigwe y Aluko, 2012).

Para el hallazgo e identificación de péptidos bioactivos en matrices alimentarias se pueden llevar a cabo análisis *in vitro* o *in silico* (Kussmann y Van Bladeren, 2011). Los métodos *in vitro* consisten en: la selección de una fuente de proteína alimentaria apropiada; la hidrólisis enzimática por enzimas específicas, fermentación, y/o digestión gastrointestinal; el cribado *in vitro* de las potenciales actividades biológicas; el fraccionamiento de la mezcla de péptidos; el análisis de la estructura del péptido y el diseño de estructuras sintéticas análogas o péptidos miméticos para validar su bioactividad *in vitro* e *in vivo*.

El reciente desarrollo de la combinación de herramientas computacionales y bases de datos de péptidos bioactivos han dado lugar a que el enfoque basado en la bioinformática o el análisis *in silico* para el descubrimiento de los péptidos bioactivos cobre cada vez una mayor importancia. A diferencia de los enfoques empíricos que normalmente implican gastos significativos, la bioinformática proporciona una estrategia rentable a través de la reducción de diferentes etapas del flujo de trabajo tradicional (Figura I.4) (Saavedra *et al.*, 2013; Sánchez-Rivera *et al.*, 2014).

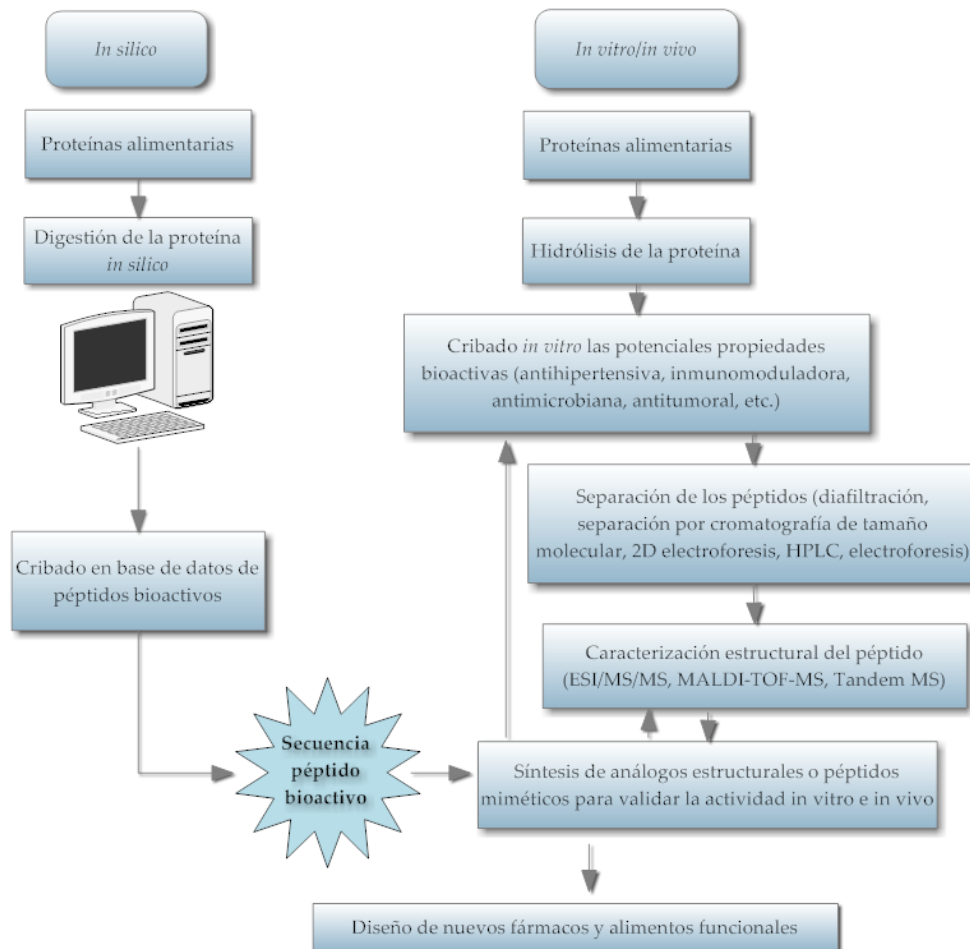


Figura I. 4. Diagrama de flujo del análisis de péptidos bioactivos de alimentos mostrando las estrategias integradas de producción y purificación para la caracterización funcional y estructural. (Adaptado de Saavedra *et al.*, 2013).

Las estrategias “omic” incluyen la biología celular, inmunología, bioquímica, síntesis química y el uso de librerías con la espectrometría de masas para identificar el patrón de la formación de los péptidos y la bioactividad de los péptidos presentes en la muestra. El protocolo típico consiste en la purificación de la muestra, la separación de las proteínas o los péptidos por electroforesis en gel en dos dimensiones (2D-PAGE) o cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC), la digestión enzimática (en el caso de proteínas intactas) y la identificación por espectrometría de masas (MS) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El uso de esta metodología ha permitido la caracterización de

los péptidos naturalmente presentes en la leche humana (Picariello *et al.*, 2008), lo que permitió además la detección de secuencias con bioactividad.

La utilización de técnicas de monitorización de múltiples reacciones (MRM) se ha llevado a cabo para el estudio de la formación de secuencias con actividad inhibidora de la ECA en la leche (Gómez-Ruiz *et al.*, 2007) y durante la maduración del queso Manchego (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004).

La metodología de superficie de respuestas (RSM) ha demostrado ser de gran utilidad en la optimización de las variables de la proteólisis tales como el tiempo, la temperatura, el pH, la enzima o cepa bacteriana así como la concentración del sustrato, cuando se está buscando una actividad específica (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012). Por ejemplo, la producción de hidrolizados con actividad antioxidante a partir de concentrados de proteínas del suero con termolisina (Conteras *et al.*, 2011) y la fermentación de leche agria con *Lactobacillus helveticus* para obtener péptidos inhibidores de la ECA (Pan y Guo, 2010), fue asistida por RSM previamente a la identificación de los péptidos (Sánchez-Rivera *et al.*, 2014).

También la espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) se ha convertido en una importante herramienta analítica en la identificación de péptidos y la evaluación de su papel en procesos biológicos. Desafortunadamente, esta estrategia puede no ser lo suficientemente exhaustiva para la identificación de mezclas complejas de péptidos, que es lo que en la mayoría de los casos encontramos en los alimentos. La muestra podría tener tanto fracciones hidrofóbicas como hidrofílicas de péptidos, en cuyo caso el análisis directo de esta muestra con el MALDI-TOF-MS no permitiría la desorción de todos los componentes, debido al fenómeno de supresión que tiene lugar en el análisis de matrices complejas de péptidos. En estos casos, la cobertura de las secuencias puede ser mejorada a través del uso de varias matrices. El ácido sinapínico (SA) es más adecuado para el análisis de proteínas intactas o fragmentos peptídicos grandes, mientras que el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) permite una mejor detección de péptidos de tamaño medio. En estudios más recientes se ha probado la utilidad del uso de al menos dos matrices lo que permite el incremento del doble de cobertura de cada proteína. Por ejemplo, el uso de la matriz de HCCA junto con SA ha permitido la obtención de una buena

cobertura de proteínas hidrofílicas, y la matriz formada por el ácido 2,5-dihidroxibenzoico con SA la obtención de una buena cobertura para las proteínas hidrofóbicas (Gonnet *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2013).

Otro aspecto es la necesidad de desarrollar tecnologías para la identificación de péptidos bioactivos de bajo peso molecular. El enfoque más simple y más utilizado se basa nuevamente en el análisis mediante MALDI-TOF-MS, pero la supresión matricial a menudo impide la detección de componentes de bajo peso molecular debido, en este caso, a la interferencia de la matriz. Un método adecuado para el análisis de péptidos pequeños en mezclas complejas sin necesidad de un pretratamiento extensivo de la muestra es el de desorción/ionización láser asistido por nanoestructura (NALDI). Éste es un método libre de matriz y por lo tanto proporciona una mejor intensidad de señal para los componentes de bajo peso molecular comparado con el MALDI que usa matriz. El NALDI ha sido aplicado con éxito en análisis de los péptidos de la leche de vaca y calostro (Kütt *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2013).

Los estudios bioinformáticos a menudo están basados en la posibilidad de predecir la proteólisis de proteínas alimentarias a partir del conocimiento de la especificidad del sitio activo de las enzimas (Panchaud *et al.*, 2012). La predicción de la actividad biológica de los péptidos está estrechamente relacionada con el estudio de las interacciones entre la estructura del péptido y el receptor diana.

La Figura I.5 muestra como dos isómeros conformacionales de un péptido de la β -caseína interactúan de manera distinta con el sitio activo de la ECA, dando lugar a diferentes comportamientos de inhibición (Gómez-Ruiz *et al.*, 2004). Los modelos muestran la interacción entre el péptido inhibidor, con *trans* y *cis*-Pro en el extremo C-terminal (gris claro) y el sitio activo de la ECA (gris oscuro). Se trata de un modelo modificado con DS Viewer Pro 5.0 (Accelrys) de la estructura cristalina del lisinopril unido a la ECA-I de *Drosophila* (código PDB 1J36). Los puentes de H se indican con línea discontinua y los grupos CO y COO- se indican en negro. El cambio de conformación de *trans*-Pro a *cis*-Pro da como resultado la ruptura de los puentes de H del grupo CO (indicado con una flecha) por desplazamiento del mismo.

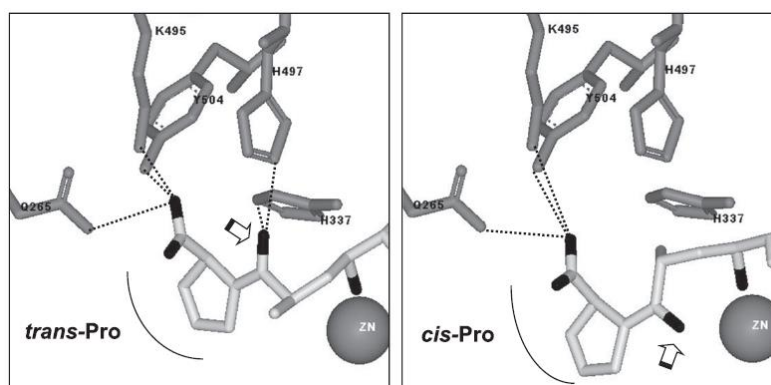


Figura I. 5. Modelos de la interacción entre el péptido inhibidor, con *trans* y *cis*-Pro en el extremo C-terminal (gris claro), y el sitio activo de la ECA-I (gris oscuro) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2004).

Recientemente, los modelos de relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR) han desarrollado un papel importante en la identificación de péptidos bioactivos (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012). El análisis QSAR trata de elucidar las relaciones de estructura-actividad mediante descriptores físico-químicos para predecir actividades biológicas de secuencias de péptidos. Es un método que se ha utilizado con éxito en oligopéptidos y tripéptidos para analizar su actividad inhibidora de la ECA (Sagardia *et al.*, 2013; Toropova *et al.*, 2012), o para la evaluación de diferentes proteínas de alimentos como precursoras de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Gu *et al.*, 2011).

También la actividad antioxidante se puede evaluar mediante análisis vía QSAR. Por ejemplo, Li y Li (2013) desarrollaron 17 descriptores físicoquímicos y Li *et al.* (2011) desarrollaron un modelo predictivo basado en el aminoácido en la segunda posición del extremo C-terminal; este último descriptor ha sido utilizado por Shu *et al.* (2013) como predictor de la actividad antimicrobiana en péptidos.

Las técnicas de QSAR utilizan las bases de datos sobre péptidos y proteínas que incluyen amplia información sobre bioactividad, parámetros físicoquímicos, referencias, etc. Entre las bases de datos de péptidos bioactivos, BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008) está considerada como una de las más importantes, a día de hoy con más de 3400 entradas clasificadas según la actividad biológica específica. Además BIOPEP ofrece la posibilidad de la proteólisis *in silico* de más de 700 proteínas. Otras bases de datos son Pepbank, BioPD y SwePep (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012).

I.3. ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

El término “péptido bioactivo” fue mencionado por primera vez por Mellander e Isaksson en 1950 (Mellander, 1950) que observaron que los péptidos fosforilados de la caseína favorecían la unión del calcio a los huesos en niños con raquitismo. En 1979, Zioudrou *et al.* (1979) describieron un efecto opioide en péptidos derivados de la hidrólisis del gluten. Desde entonces, y especialmente durante las últimas dos décadas, un gran número de investigaciones se han dedicado a la identificación de péptidos con diferentes efectos fisiológicos descubriéndose gran cantidad de péptidos bioactivos procedentes de alimentos tanto de origen animal como vegetal (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Rémond *et al.*, 2016). De las proteínas principales de leche, carne, pescado, cereales, pseudocereales y granos de leguminosas, se pueden obtener hasta 20.000 péptidos bioactivos (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2017).

Los péptidos bioactivos generalmente corresponden a péptidos de 2 a 20 aminoácidos y peso molecular menor de 6000 Da, aunque moléculas más grandes, como el caseinmacropéptido, han demostrado también actividad (Mora *et al.*, 2014; Rémond *et al.*, 2016; Sarmadi e Ismail, 2010). De hecho, algunos autores aumentan el rango de tamaño de los péptidos bioactivos de 2 a 30 aminoácidos (Lafarga y Hayes, 2014; Liu *et al.*, 2016) e incluso hasta los 50 aminoácidos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

La actividad de los péptidos se basa en su composición aminoacídica y la localización de los aminoácidos dentro de la secuencia que conforma el péptido (Mora *et al.*, 2016); y su función específica, depende en gran parte de sus estructuras primaria y secundaria, que a su vez dependen de la naturaleza de la proteína precursora, la especificidad de la proteasa utilizada, y las condiciones de hidrólisis o producción de los péptidos (Pihlanto, 2016).

La hidrólisis enzimática de las proteínas da a lugar a péptidos con propiedades físico-químicas (como el peso molecular, distribución de las cargas, punto isoeléctrico, ionización e índice hidrofílico/hidrofóbico) diferentes a las de la proteína originaria. Estos cambios en la estructura primaria y secundaria son los responsables de las propiedades bioactivas observadas en los péptidos resultantes (Agyei *et al.*, 2016). Mientras que la secuencia primaria es la responsable de la estructura y la función biológica (Korhonen y Pihlanto, 2006),

en gran medida se atribuye a la estructura secundaria las características de unión a nivel sistémico de los péptidos (Kaur *et al.*, 2007). Y, en algunos casos, péptidos clasificados como multifuncionales, son capaces de inducir más de una actividad fisiológica bajo dos condiciones indispensables: que tengan una única estructura primaria capaz de resistir proteólisis y que muestren dos o más acciones biológicas, y/o que contengan una o más secuencias superpuestas, cada una de las cuales desencadenen diferentes respuestas fisiológicas (Meisel, 1998; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005). En muchos casos, la actividad biológica de los péptidos se atribuye a ciertos aminoácidos clave. Por ejemplo, los aminoácidos Pro y Val juegan un importante papel en la mayoría de los péptidos antihipertensivos (Agyei *et al.*, 2016; Korhonen y Pihlanto, 2006).

Los péptidos bioactivos se pueden clasificar según su actividad en: ligandos para receptores, inhibidores enzimáticos, moduladores de transporte, péptidos antimicrobianos y péptidos antioxidantes (Yoshikawa, 2015). Estos péptidos bioactivos tienen varias cualidades que los hacen adecuados como agentes terapéuticos, como son: alta especificidad de receptores, alta actividad y amplio espectro de acción, baja toxicidad y baja acumulación en tejidos (en comparación con otras moléculas pequeñas), gran diversidad estructural y tamaño pequeño con respecto a los anticuerpos, lo que favorece su transporte y difusión y también una baja probabilidad de provocar respuestas inmunes indeseables (Agyei *et al.*, 2016). Comparados con otras sustancias bioactivas, los péptidos ejercen una importante acción reguladora sobre el metabolismo incluso a dosis bajas. Varios tipos de péptidos bioactivos han sido identificados en la medicina tradicional china, a los cuales se les atribuye las mismas funciones que las relacionadas con las conocidas de manera tradicional, por lo que se llega a sugerir que algunos tratamientos de la medicina tradicional china, especialmente los ricos en proteínas, pueden deber su eficacia a la presencia de estos péptidos. (Liu *et al.*, 2016).

I.3.1. Actividad antihipertensiva.

Entre los péptidos bioactivos, los que presentan actividad antihipertensiva son probablemente los más estudiados y, dentro de éstos, los procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias (Korhonen, 2007, 2009; Li *et al.*,

2004; Murray *et al.*, 2005; Murray y FitzGerald, 2007; Saito, 2008). Este creciente interés en los péptidos antihipertensivos se basa en que la hipertensión, que constituye uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, afectó en el 2000 a más del 25% de la población mundial (aproximadamente un billón) y se espera que aumente hasta un 1,56 billones en el 2025 (Kearney *et al.*, 2005). La hipertensión es una enfermedad crónica que se manifiesta con altos niveles de presión arterial (valores sistólicos y diastólicos de ≥ 140 mm Hg y ≥ 90 mm Hg, respectivamente) y se caracteriza por una insuficiente relajación de los vasos y un flujo sanguíneo reducido. Si no es tratada, la hipertensión puede llevar a un riesgo insuficiente de órganos vitales lo que puede causar infarto y eventualmente la muerte (Aluko, 2015).

En el cuerpo humano la presión sanguínea está regulada principalmente por el sistema renina-angiotensina (SRA) en el que intervienen dos proteasas, la renina y la enzima convertidora de angiotensina-I. La renina (EC 3.4.23.15) es una enzima de 37 kDa que hidroliza el enlace peptídico Leu₁₀-Val₁₁ del angiotensinógeno (una proteína de 55 kDa sintetizada en el hígado) para producir un decapeptido, la angiotensina I inactiva (Imai *et al.* 1983; Acharya *et al.* 2003).

La ECA (EC 3.4.15.1) es una dipeptidil carboxipeptidasa dependiente de zinc que juega un importante papel en la regulación de la presión sanguínea catalizando la conversión del decapeptido angiotensina I en un potente vasoconstrictor, el octapéptido angiotensina II (Akif *et al.*, 2010; Fleming, 2006; Koike *et al.*, 1980). En condiciones patológicas hay un aumento de la actividad de la renina y/o ECA, lo que causa altos niveles de angiotensina II en sangre, dando lugar a una excesiva contracción de los vasos sanguíneos. La ECA también actúa inactivando la bradiquinina (un péptido vasodilatador), lo que contribuye a una insuficiente relajación de las paredes de los vasos sanguíneos. Al igual que el SRA, la producción de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) es un importante mecanismo para el mantenimiento de la presión arterial fisiológica. El NO es un agente vasodilatador que ayuda a mantener valores de presión sanguínea regulares, por lo tanto, cuando hay niveles insuficientes de NO (especialmente con altos niveles de angiotensina II), se produce una menor dilatación y una mayor contracción de los vasos. Sobre la base de estos factores inductores de hipertensión, los tratamientos con fármacos tradicionales han utilizado compuestos que inhiben la actividad de la renina y/o ECA así como

también aquellos que reducen o inhiben la unión de la angiotensina II a sus receptores o aquellos que aumentan los niveles de NO en sangre (Aluko, 2015).

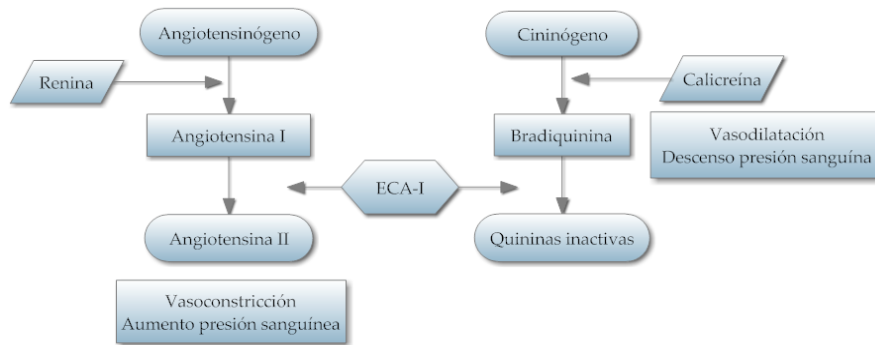


Figura I. 6. Breve descripción del sistema renina-angiotensina, el principal sistema de regulación de la presión sanguínea y balance hídrico en el cuerpo humano (Mora *et al.*, 2016).

Existen dos isoformas de la ECA en los mamíferos: la ECA somática (sECA), que está presente en los tejidos y se compone de dos dominios (un dominio N y un dominio C), y la ECA testicular (tECA) que se encuentra únicamente en los testículos de los mamíferos adultos. Ambas isoformas están codificadas por el mismo gen, pero las transcripciones por parte de los RNAs mensajeros comienzan en distinta posición. Las dos tienen un alto nivel de homología en el dominio C, pero la sECA contiene una secuencia única en el residuo 36 en el extremo N-terminal (Li *et al.*, 2007). Algunos estudios han mostrado que el dominio C es el más importante en la regulación de la presión sanguínea de la sECA. El dominio C tiene una mayor constante catalítica para la angiotensina I y el sustrato no fisiológico hipuril-histidil-leucina (HHL) (Wei *et al.*, 1991).

La inhibición de la ECA se traduce en un descenso de la presión arterial. Los primeros inhibidores de la ECA se sintetizaron a partir del veneno de un grupo de crotalinos conocidos como víboras de foseta; actualmente en el tratamiento de la hipertensión se utilizan inhibidores sintéticos como captopril, enalapril, lisinopril o ramipril (Ondetti *et al.*, 1977; Patchett *et al.*, 1980). Estos compuestos sintéticos, aunque efectivos frente a la hipertensión, presentan efectos secundarios como tos seca, reacciones alérgicas, disgeusia o urticaria; circunstancia ésta que

pone de manifiesto la necesidad de obtener inhibidores de la ECA naturales y seguros.

Originariamente, los péptidos inhibidores de la ECA fueron obtenidos de hidrolizados de gelatina. Actualmente se han identificado cientos de péptidos inhibidores de la ECA procedentes de la hidrólisis de proteínas de muchos tipos de alimentos como la leche, el pescado, la carne, los huevos, la soja, el maíz, el trigo y algas marinas (Mora *et al.*, 2016). Las secuencias y actividad inhibidora de la ECA de algunos de estos péptidos son considerablemente diferentes.

Debido a que la actividad principal de la ECA es escindir el dipéptido del extremo C-terminal de sustratos oligopeptídicos con una amplia especificidad, la actividad inhibidora de la ECA (IECA) de los péptidos está muy influenciada por la secuencia del tripéptido de su extremo C-terminal (Ni *et al.*, 2012). Cabe destacar en el caso de la leche dos lactotripéptidos, Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP), que han demostrado su efecto hipotensor en el marco una dieta adecuada y un estilo de vida saludable (Aihara *et al.*, 2005; Boelsma y Kloek, 2008; Jauhiainen *et al.*, 2005; Mizuno *et al.*, 2005; Mizushima *et al.*, 2004; Pripp, 2008; Tuomilehto *et al.*, 2004).

Estos péptidos inhibidores de la ECA pueden actuar como inhibidores competitivos, no competitivos o acompetitivos (Je *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Nakagomi *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2002; Suetsuna y Nakano, 2000; Zhao *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Inhibidores competitivos:

Los inhibidores competitivos pueden unirse: 1) al sitio activo y bloquearlo, o 2) a un centro alostérico, alterándose la conformación de la enzima de tal forma que el sustrato no puede unirse más al sitio activo (Hong *et al.*, 2008). Por ejemplo, NLP, NG (Wu y Ding, 2002), YN (Tsai *et al.*, 2008), LGFPTTKTYFPHF, VVYPWT (Yu *et al.*, 2006), LNVPGEIVE, NIPPLTQTPV, DKIHPP (Gobbeti *et al.*, 2000), LF, WA y WM (Ono *et al.*, 2006) han sido identificados como inhibidores competitivos. Se ha descrito que los sitios activos de los dos dominios (C y N) de la sECA, son estructural y funcionalmente homólogos a una dipeptidil carboxipeptidasa, por lo que la geometría de la coordinación del zinc es crítica para su acción hidrolítica (Ondetti *et al.*, 1977). Sin embargo, no sólo los dos sitios activos son activados de manera diferente por iones cloruro, sino que el sustrato

fisiológico angiotensina I se une preferentemente al dominio C. Estas diferencias indican que a pesar del alto nivel de homología en la secuencia primaria, existen diferencias estructurales y funcionales entre los dos sitios activos de los dominios C y N.

Por otro lado, los dos sitios activos poseen tres subsitios, S1 (antepenúltimo), S1' (penúltimo), S2' (último) de diferente composición aminoacídica y con características distintas para la unión de aminoácidos C-terminales de sustratos o inhibidores (Figura I.7). Para la unión e interacción inhibidor-enzima, estos tres subsitios principales del sitio activo de la enzima deben estar unidos con la sustancia inhibidora. Como ya se ha explicado, la unión del inhibidor o del sustrato natural a la enzima tiene lugar predominantemente a través de los residuos de tripéptidos C-terminales. Los péptidos con alta actividad inhibidora de ECA tienen Trp, Phe, Tyr o Pro en su extremo C-terminal y aminoácidos alifáticos ramificados en el extremo N-terminal, y se sabe que la ECA tiene poca afinidad hacia los inhibidores con aminoácidos dicarboxílicos C-terminales, tales como Glu (Li *et al.*, 2004). Más concretamente, la unión enzima-sustrato se ve favorecida por la presencia de aminoácidos aromáticos.

Por otra parte, los aminoácidos Pro, Ala, Val y Leu favorecen la unión a la posición antepenúltima (S1), la presencia de Ile favorece la unión en la penúltima posición (S1') y finalmente, Pro y Leu son más favorables para la unión en la posición final (S2') (Odetti y Cushman, 1982; Choi *et al.*, 2001). Sin embargo, hay varios péptidos tales como NNTGHNFFENTGEAM (Lee *et al.*, 2009) y WM (Ono *et al.*, 2006) que no encajan en el modelo.

Además, los estudios de estructura-actividad indican que la ECA se une con mayor facilidad a aquellos sustratos o inhibidores competitivos que contengan residuos aminoacídicos hidrofóbicos (aromáticos o con cadenas laterales ramificadas) en cada una de las tres posiciones carboxilo terminales; asimismo la presencia de Lys o Arg como residuo C-terminal aporta una carga positiva, que puede potenciar la unión a la ECA (López-Fandiño *et al.*, 2007). De la misma forma, la presencia de Pro como aminoácido C-terminal o como antepenúltimo aminoácido de la cadena mejora la unión con la ECA. Sin embargo, la presencia de esta misma Pro en penúltima posición debilita la unión con la ECA (Choi *et al.*, 2001; FitzGerald *et al.*, 2004; Meisel, 1997a, 1997b; Odetti y Cushman, 1982).

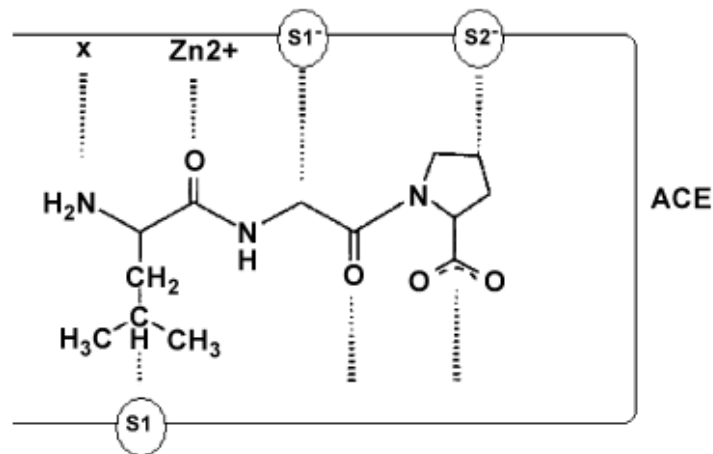


Figura I. 7. Sitio activo de la ECA mostrando las interacciones entre los péptidos inhibidores de la ECA y la ECA (Hong *et al.*, 2008).

1.3.1.2. Inhibidores no competitivos:

El sistema de inhibición no competitivo se caracteriza por que la unión de inhibidor y sustrato a la enzima puede producirse simultáneamente. Cuando ambos, sustrato e inhibidor, están unidos, el complejo enzima-sustrato-inhibidor no puede formar el producto, sólo puede convertirse de nuevo en el complejo enzima-sustrato o el complejo enzima-inhibidor (Si *et al.*, 2009). Algunos péptidos derivados de proteínas alimentarias han sido descritos como inhibidores no competitivos de la ECA, como por ejemplo: IFL, WL (Kuba *et al.*, 2003), KVREGTTY, KVREGT (Lee *et al.*, 2006), VVYPWTQRF (Wang *et al.*, 2008), DLTDY (Shiozaki *et al.*, 2010), VECYGNRPQF (Sheih *et al.*, 2009) y MIFPGAGGPEL (Jung *et al.*, 2006).

El sitio de inhibición de los péptidos no está especificado debido a la diversidad de estructuras de los mismos derivados de diferentes proteínas parentales y, a que el mecanismo de inhibición no competitivo de los péptidos sobre la ECA no está claro todavía. Para entender el mecanismo de inhibición, el TPTQQS, un hexapéptido que actúa como inhibidor no competitivo de la ECA para prevenir la formación del producto de la reacción His-Ala, fue usado para estudiar las interacciones entre la ECA, el TPTQQS, y el sustrato no fisiológico hipuril-His-Leu (Ni *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos mostraron que cuando la ECA está en su forma libre, el ion zinc y el HEXXH (los residuos clave de aminoácidos del sitio activo de la ECA) componen el sitio activo de la ECA y el

hipuril-His-Leu puede entrar al sitio activo y formarse el producto de la reacción. Después de que TPTQQS entra en la ECA, los residuos Thr₁, Thr₂ y Gln₄ permiten al péptido interactuar con la estructura de la tapa de la tECA, la Ser₆ en el C-terminal empuja el ion zinc fuera del sitio activo a través de enlaces de coordinación entre la Ser y el ion zinc, resultando en una inhibición no competitiva de la ECA por el TPTQQS (Figura I.8) (Ni *et al.*, 2012).

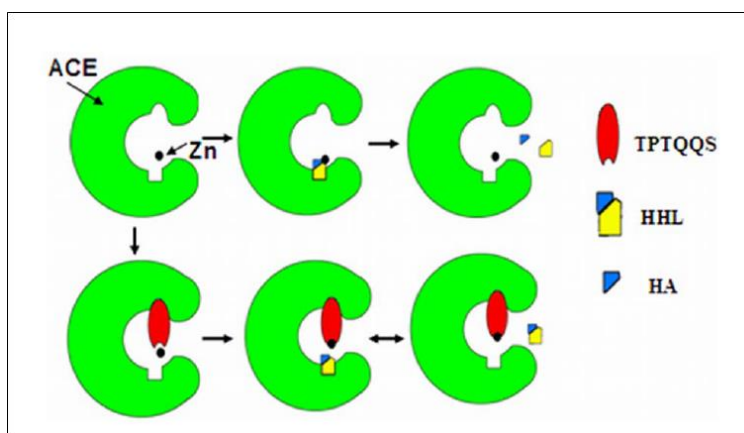


Figura I. 8. Modelo de inhibición de la ECA por el péptido TPTQQS. El modelo muestra que el TPTQQS desplaza el ion zinc fuera del sitio activo para inhibir a la ECA (Ni *et al.*, 2012).

Aunque se ha propuesto este modelo de inhibición no competitiva de la ECA utilizando el TPTQQS, otros péptidos que funcionan como inhibidores no competitivos podrían no encajar en este patrón debido a la variedad en su longitud y composición. Es necesaria una mayor investigación para identificar la relación entre el mecanismo de acción y la estructura de estos péptidos (Jao *et al.*, 2012).

1.3.1.3. Inhibidores acompetitivos:

En la inhibición acompetitiva, el péptido que actúa como inhibidor se puede unir sólo al complejo enzima-sustrato y disminuye la actividad máxima de la enzima por lo que el sustrato o el producto tardan más tiempo en abandonar el sitio activo. Los péptidos como IW, FY, AW (Sato *et al.*, 2002) y YLYEIARR

(Nakagomi *et al.* 1998) actúan como inhibidores acompetitivos de la ECA. Sin embargo, el mecanismo de inhibición no está claro todavía (Jao *et al.*, 2012).

El hecho de que la ECA es una dipeptidasa hace posible la hidrólisis de los péptidos inhibidores y que se afecte su actividad antihipertensiva *in vivo*. Dependiendo del resultado de la digestión gastrointestinal y la acción de otras enzimas *in vivo*, los péptidos inhibidores de la ECA se pueden clasificar como inhibidores puros (es decir, la actividad inhibidora de la ECA se mantiene sin cambios), profármacos (después de la digestión de los péptidos la actividad inhibidora de la ECA se ve aumentada) o sustratos (después de la digestión de los péptidos la actividad inhibidora de la ECA disminuye) (Iroyukifujita *et al.*, 2000). Sin embargo, los sitios activos de estos péptidos los cuales actúan como inhibidores competitivos, no competitivos o acompetitivos no se conocen, y el mecanismo exacto de inhibición de la ECA de los péptidos no está claro. Es necesaria una mayor investigación para correlacionar el modo de inhibición de los péptidos con su estructura (Jao *et al.*, 2012).

I.3.2. Actividad antioxidante.

Uno de los efectos secundarios del metabolismo oxidativo es la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno que, en concentraciones elevadas, pueden producir daños celulares e incluso inducir la apoptosis mediante la oxidación de proteínas, lípidos de membrana, ADN y enzimas (Sharma *et al.*, 2011).

El consumo de antioxidantes puede disminuir el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, y entre las moléculas con capacidad antioxidante encontramos péptidos bioactivos procedentes de la hidrólisis de caseínas, proteínas de suero lácteo, proteínas de yema de huevo, proteínas miofibrilares y proteínas de organismos marinos (Girgih *et al.*, 2013; Hipkiss y Brownson, 2000; Ko *et al.*, 2013; Korhonen y Pihlanto, 2003; Lynch y Kerry, 2000; Pihlanto, 2006; Rival *et al.*, 2001a, 2001b; Ryan *et al.*, 2011; Suetsuna *et al.*, 2000; Tokunaga *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013).

Los péptidos antioxidantes pueden actuar evitando la formación de radicales libres o compitiendo con los mismos. Esta actividad antioxidante depende en gran medida de su peso molecular, de su composición aminoacídica

y, dentro de ésta, de su secuencia y su hidrofobicidad (Ren *et al.*, 2014a, 2014b; Wang *et al.*, 2014). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que el menor peso molecular de los péptidos favorece su capacidad antioxidante (Cai *et al.*, 2015; Chen y Li, 2012; Esteve *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2013; Ngoh y Gan, 2016).

Por otro lado, los péptidos con alta capacidad antioxidante suelen presentar una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos. Este hecho se considera clave en su capacidad captadora de radicales, dado que el mecanismo de acción podría iniciarse con la entrada del péptido en los órganos diana a través de interacciones hidrófobas con las bicapas lipídicas de la membrana (Pouzo *et al.*, 2016; Saidi *et al.*, 2014; Sudhakar y Nazeer, 2015).

La His presenta una elevada capacidad antioxidante debido a su anillo imidazólico, que utiliza como donador de protones (Samaranayaka y Li-Chan, 2011; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). La presencia de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Pro) aumenta la capacidad antioxidante del péptido; y además, los anillos indólico y pirrolidínico del Trp y la Pro, respectivamente, pueden captar radicales hidroxilo actuando como donadores de electrones (Girgih *et al.*, 2014; Mendis *et al.*, 2005a). Por otra parte, Gly, Lys, Ile y Val generan un microambiente hidrofóbico en la molécula, que favorece la capacidad antioxidante del péptido; e igualmente, la carga negativa de los Glu y Asp les permiten captar radicales libres actuando como donadores de electrones (Bougatef *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012).

El anillo indólico del Trp, como se indicó anteriormente, influye en la capacidad antioxidante de los péptidos por su capacidad de captar radicales hidroxilo; sin embargo ésta no es su única contribución al carácter antioxidante, ya que también puede donar protones además de estabilizar a los aminoácidos adyacentes en la cadena. Por otro lado, la Cys posee un grupo sulfhidrilo que también es capaz de ceder protones; así, la combinación de Cys y Trp en la misma cadena peptídica suponen un aumento en su capacidad antioxidante (Tian *et al.*, 2015).

Finalmente, la presencia de Val o Leu en un extremo N-terminal que contenga Pro, His o Trp contribuyen positivamente a la capacidad antioxidante; mientras que la presencia de Leu o de combinaciones Ser-Leu, Thr-Leu y Pro-Leu en los extremos C o N-terminales aumentan la capacidad de captación de radicales libres por parte del péptido (Ren *et al.*, 2008; Farvin *et al.*, 2010a, 2010b).

I.3.3. Actividad quelante de minerales.

Los iones de metales de transición están involucrados en muchas reacciones de oxidación *in vivo*. El ion ferroso es uno de los productos formados en la reacción de Fenton donde el superóxido de hidrógeno produce el radical hidroxilo (Afanas'ev *et al.*, 1989). Los iones ferrosos (Fe^{2+}) pueden también catalizar la reacción de Haber-Weiss que induce al anión superóxido a la formación de más radicales hidroxilos peligrosos. Los radicales hidroxilo reaccionan rápidamente con las biomoléculas adyacentes y producen daños severos (Baratzadeh *et al.*, 2013). Los iones metálicos tales como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} generan radicales libres que podrían iniciar peroxidación lipídica y comenzar una reacción en cadena (Halliwell y Gutteridge, 1990). Por lo tanto, la actividad quelante del Fe^{2+} podría inhibir la oxidación lipídica catalizada por metales (Chen *et al.*, 2009).

Los péptidos quelantes de minerales son de gran importancia en la industria alimentaria y farmacéutica ya que pueden servir como transportadores de micronutrientes, facilitando su absorción, debido al sistema específico de transporte para los péptidos de cadena corta en el sistema digestivo (Clemente, 2000). Estos péptidos podrían por tanto ser utilizados para aumentar la biodisponibilidad de los minerales y para prevenir la oxidación, manteniendo la calidad y apariencia visual de los productos alimentarios (Eckert *et al.*, 2013).

En lo que se refiere a la capacidad quelante de los péptidos, la presencia de His en el extremo C-terminal de la cadena peptídica proporciona capacidad quelante de hierro II al establecerse un enlace de coordinación entre el grupo NH de la His y el hierro; esta capacidad quelante se ve aumentada cuando, simultáneamente, en el extremo N-terminal encontramos β -Ala (Canabady-Rochelle *et al.*, 2015; Zarei *et al.*, 2014). Asimismo, la combinación de los anillos indólico, bencénico y fenólico de Trp, Phe y Tyr, dota a esta combinación aminoacídica de capacidad quelante de hierro II (Zarei *et al.*, 2014).

Los caseinfosfopéptidos poseen capacidad quelante de minerales; esta capacidad está relacionada con la remineralización del esmalte dental así como con el aumento de la absorción y biodisponibilidad intestinal de minerales como calcio, zinc, cobre, manganeso y hierro. La mayoría de los caseinfosfopéptidos contienen en común, una secuencia de tres fosfoserinas seguidos por dos residuos

de Glu (Gobbetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011). Estas secuencias dotan a los péptidos de la capacidad de mantener al calcio, fósforo y otros minerales en solución a los valores de pH intestinal, ya que las cargas negativas de las cadenas laterales, fundamentalmente de los grupos fosfato de estos aminoácidos, constituyen el sitio de unión con los minerales (Gobbetti *et al.*, 2007).

Esta relevancia de los grupos fosfato se pone de manifiesto en el hecho de que los péptidos defosforilados no forman enlace con los minerales (Berrocal *et al.*, 1989), mientras que la fosforilación de la α_{s1} -caseína y la β -caseína aumenta la capacidad de unión y la estabilidad de estas proteínas en presencia de calcio (Yoshikawa *et al.*, 1981). Estos péptidos quelantes son resistentes a la proteólisis gracias a su marcado carácter aniónico, que les permite formar complejos solubles con el calcio; impidiendo de esta forma también, la formación de fosfato cálcico insoluble (Berrocal *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1986).

La hidrólisis con *Flavourzyme*[®] de plasma porcino genera dos péptidos quelantes de minerales: uno quelante de calcio (VSGVEDVN) y otro quelante de hierro (DLGEQYFKG), ambos con una potencia similar (Lee y Song, 2009a, 2009b). Por otra parte, péptidos obtenidos de pescado han mostrado ser capaces de acelerar la absorción de calcio (Jung *et al.*, 2005); así el fosfopéptido obtenido a partir de los huesos del pescado, con un 23,6% de fósforo, que es capaz de unirse al calcio (evitando la formación de fosfato cálcico insoluble) se ha postulado como nutracéutico en la prevención de osteoporosis (Jung *et al.*, 2005; Khora, 2013).

I.3.4. Actividad antimicrobiana.

Se ha descrito la presencia natural de péptidos antimicrobianos en una amplia variedad de fuentes, desde microorganismos hasta animales y plantas. No obstante, también es posible generarlos mediante la hidrólisis de proteínas alimentarias. Estos péptidos presentan efecto inhibitorio frente a microorganismos alimentarios alterantes y también frente a patógenos (bacterias, hongos, virus y parásitos), postulándose algunos de ellos como potenciales coadyuvantes en tratamientos frente a distintas infecciones (Mora *et al.*, 2016).

La eficacia de los péptidos antimicrobianos viene dada por su concentración mínima inhibitoria, mientras que su eficiencia y mecanismo de acción dependen de sus características estructurales (Dziuba y Dziuba, 2014; Najafian y Babji,

2012). Los péptidos procedentes de fuentes animales muestran mayor capacidad inhibitoria y frente a un mayor rango de microorganismos que los producidos por bacterias; sin embargo estos últimos presentan una mayor eficiencia a concentraciones bajas o muy bajas (Nagao *et al.*, 2006; Rydlo *et al.*, 2006). Por otra parte, los péptidos antimicrobianos comparten una serie de rasgos comunes: la mayoría están formados por menos de 50 aminoácidos, aproximadamente la mitad de sus aminoácidos son hidrofóbicos, presentan carga neta positiva y poseen una estructura tridimensional anfipática (Nguyen *et al.*, 2011; Rydlo *et al.*, 2006). Estas dos últimas características les permiten interaccionar de forma electrostática con las membranas bacterianas aniónicas y se consideran esenciales para su actividad antimicrobiana (Jenssen *et al.*, 2006).

Los dos principales mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos son: desestabilización de la membrana celular y aumento de la permeabilidad de la misma; en ambos, la estructura anfipática de los péptidos parece jugar un papel fundamental (Reddy *et al.*, 2004). Como se indicó anteriormente, la interacción entre los péptidos y la membrana celular se lleva a cabo mediante las fuerzas electrostáticas que se generan entre la carga positiva del péptido y la carga negativa de la superficie de la membrana. En el caso de bacterias Gram negativas las cargas proceden de los grupos fosfato presentes en los lipopolisacáridos, mientras que en las Gram positivas se deben a los ácidos lipoteicoicos de la superficie celular (Jenssen *et al.*, 2006).

Cuando la concentración relativa entre péptido y lípido es baja, el péptido se suele orientar de forma paralela en la membrana, siendo inactivo. Sin embargo, cuando la concentración relativa del péptido se incrementa, éste tiende a tomar una posición perpendicular a la membrana, insertándose y orientando los residuos hidrofóbicos hacia la región hidrofóbica de la membrana. La capacidad de aceptación de la membrana por una mayor cantidad de péptido dependerá de la composición lipídica y propiedades físico-químicas de la misma. Esto explica los diferentes grados de aceptabilidad de una célula por un determinado péptido, y la especificidad hacia ciertas bacterias (López-Brea y Alarcón, 1999; Montañón-Pérez, 2002; Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

Para poder explicar el mecanismo de permeabilización de la membrana por los péptidos antimicrobianos se han propuesto diversos modelos: alfombra, duela

de barril, poro toroidal, agregación, electroporación molecular y balsa lipídica (Brogden, 2005; Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2006).

– Alfombra: los péptidos actúan de forma similar a un detergente; se unen electrostáticamente a los grupos fosfatos de la membrana y van cubriendo la superficie de la misma hasta alcanzar una concentración umbral que provoca el desplazamiento de los fosfolípidos. Dicho desplazamiento supone la formación de micelas que modifican la fluidez de la membrana provocando su disrupción (Chan *et al.*, 2006; Shai y Oren, 2001). Este mecanismo es utilizado por péptidos helicoidales selectivos de membrana como el Pln 149a producido por *Lactobacillus plantarum* (Müller *et al.*, 2007).

– Duela de barril: la agrupación de las hélices anfipáticas de los péptidos genera un poro acuoso en la membrana en el que los grupos hidrofílicos se orientan hacia la luz del mismo. Simultáneamente y para estabilizar la estructura, las regiones hidrofóbicas del péptido se alinean con la región lipídica de la membrana mediante su interacción con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Se considera que actúan por este mecanismo los péptidos helicoidales citolíticos frente a membranas bacterianas y de mamíferos así como las ceratotoxinas (Bessin *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2012; Shai, 1999).

– Poro toroidal: Los péptidos antimicrobianos con α hélices se agregan en la superficie de la membrana e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sucesivamente sobre sí misma. Este hecho provoca que la capa lipídica adquiera una curvatura que permite la formación del poro, que se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas entre los péptidos y los grupos polares aniónicos de los fosfolípidos de la membrana. Adicionalmente estos fosfolípidos interactúan con las cadenas acilares de los péptidos. De esta forma, se genera un poro con los grupos hidrofílicos orientados hacia dentro, atrapando el agua en el interior del mismo (Yeaman y Yount, 2003). Péptidos como magainina-2, aureina-3,3, beta-defensinas o protegrina actúan mediante este mecanismo (Kim *et al.*, 2009).

– Modelo de agregación: Los péptidos se orientan en el espacio de la membrana como agregados, sin adoptar una orientación en particular (Brogden, 2005; Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009).

– Electroporación molecular: Algunos péptidos con elevado contenido en aminoácidos catiónicos son capaces de formar un potencial electrostático

suficiente para la formación de un poro (Brogden, 2005; Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009).

– Balsas lipídicas: Los péptidos anfipáticos pueden causar una pérdida del equilibrio electrostático en la bicapa lipídica, formándose poros transitorios (Brogden, 2005; Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009).

Estos modelos ayudan a explicar cómo los péptidos antimicrobianos desestabilizan o rompen la membrana celular, pero solamente los modelos de poro toroidal y de agregación explican además la actividad de los péptidos sobre determinadas dianas citoplasmáticas (Hancock y Sahl, 2006).

Aunque la desestabilización/permeabilización de la membrana es el principal mecanismo antimicrobiano de los péptidos, existen péptidos que ejercen su efecto mediante un mecanismo adicional. En estos casos, tras su inserción en la membrana no sólo desestabilizan la misma (adelgazamiento de la membrana, alteración de la función barrera, alteración de la integridad de la bicapa lipídica) sino que atraviesan la membrana e interactúan con dianas intracelulares afectando a procesos como la síntesis de ADN, la síntesis y el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática o la síntesis de la membrana (Brooks *et al.*, 2005; Futaki *et al.*, 2001; Hancock y Sahl, 2006; Jenssen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2000).

Las principales fuentes alimentarias de péptidos antimicrobianos son la leche y el huevo; de hecho, lisozima y lactoferrina han sido ampliamente estudiadas como precursoras de péptidos antimicrobianos y, dentro de esta última, el fragmento 17-41 conocido como lactoferricina es probablemente el péptido antimicrobiano mejor estudiado (Clare *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2016; Wakabayashi *et al.*, 2003; Walther y Sieber, 2011); de él se sabe que su interacción con la membrana de la bacteria produce un aumento de la permeabilidad, que es la base de su mecanismo de acción, mostrándose efectivo frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos (Tomita *et al.*, 1994).

Otros péptidos que han mostrado capacidad antimicrobiana son los procedentes de la hidrólisis de la hemoglobina bovina con pepsina (Nedjar-Arroume *et al.*, 2006), hidrolizados de proteínas sarcoplásmicas (Jang *et al.*, 2008), péptidos procedentes de la soja y la cebada (McClellan *et al.*, 2014), defensinas y catelicidinas procedentes de sangre de animales de granja (Yu *et al.*, 2010),

destacando los casos del caseinmacropéptido, que se ha mostrado capaz de impedir la adhesión de estreptococos y actinomicetos a los enterocitos (Neeser *et al.*, 1988).

I.3.5. Actividad inmunomoduladora.

Dentro de la asociación entre nutrición e inmunidad, diferentes estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado la existencia de péptidos bioactivos, derivados de diferentes proteínas alimentarias, con capacidad inmunomoduladora. No obstante, la mayoría de los estudios se centran en evaluar el efecto de los péptidos sobre respuestas inmunes específicas, siendo pocos los que estudian su influencia en la respuesta inmune inespecífica (Shahidi y Zhong, 2008).

Diferentes péptidos bioactivos procedentes de caseínas y poteínas del suero han mostrado capacidad inmunomoduladora; estos péptidos pueden modular la proliferación de linfocitos, disminuir la producción de determinadas citoquinas y estimular la actividad fagocítica de los macrófagos, influyendo de esta forma en el desarrollo del sistema inmune de los recién nacidos (Korhonen y Pihlanto, 2006).

I.3.6. Actividad opioide.

Entre los péptidos bioactivos encontramos tanto agonistas de opioides (endógenos y exógenos) como antagonistas; en este sentido, el primer péptido descrito fue la β -casomorfina-7 (YFPFGPI), que se obtuvo en los años 70 a partir de la hidrólisis de la caseína bovina. La unión de estos péptidos a receptores opioides en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos, influye en diferentes funciones fisiológicas entre las que encontramos funciones inmunológicas, gastrointestinales, reproductivas, conductuales y de control del estrés y la depresión (Guesdon *et al.*, 2006; Shahidi y Zhong, 2008).

De los diferentes péptidos opioides obtenidos de proteínas alimentarias, los procedentes de proteínas lácteas son los que se han estudiado en mayor profundidad, mostrando capacidad para aumentar el tiempo de tránsito intestinal, inhibir la diarrea, modular el transporte intestinal de aminoácidos,

estimular las secreciones de insulina y somatostatina, así como la capacidad analgésica y moduladora del estado de ánimo (Meisel, 1998).

No existe bibliografía sobre la producción de péptidos opioides a partir de proteínas musculares; no obstante se han encontrado secuencias opioides (Tyr-X-Phe y Tyr-X₁-X₂-Phe) encriptadas en estas proteínas; por lo que parece potencialmente posible obtener péptidos opioides a partir de la hidrólisis de proteínas musculares. En esta línea, los estudios con hidrolizados de hemoglobina bovina han demostrado la presencia de péptidos activos (hemorfinas) con afinidad por receptores opioides (Nyberg *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que los péptidos opioides juegan un papel importante en el control de la ingesta de alimentos mediante su capacidad anorexígena. Ejemplo de ello son péptidos como el VRIRLLQRFNKRS procedentes de proteína de soja o el caseinmacropéptido; asimismo en el suero lácteo se pueden encontrar péptidos que no sólo son anorexígenos sino que son capaces, también, de disminuir los niveles de colesterol LDL en sangre (Regester *et al.*, 1997; Zhang y Beynen, 1993).

I.3.7. Actividad hipocolesterolemia.

La hipercolesterolemia es uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes. La investigación sobre el tratamiento y prevención de la hipercolesterolemia no sólo se centra en los fármacos de síntesis sino también en extractos naturales con capacidad hipocolesterolemia; en este sentido diferentes proteínas y péptidos (proteína de soja, 7S globulina de soja, hidrolizado de proteína de soja, enterostatina, fragmento glicínico de soja, hidrolizados de β -lactoglobulina láctea e hidrolizados de proteína porcina) han mostrado capacidad de disminuir los niveles de colesterol, siendo los procedentes de la soja los más efectivos (Bhat *et al.*, 2015).

La leche, por su parte, es otra de las fuentes principales de péptidos hipocolesterolemiantes; por ejemplo, el hidrolizado con tripsina de la β -lactoglobulina produce un péptido (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) con capacidad para suprimir la absorción de colesterol en células Caco-2 en ensayos *in vitro* y con capacidad, *in vivo*, para reducir los niveles de colesterol sérico en ratones de laboratorio (Nagaoka *et al.*, 2001).

La actividad hipocolesterolemia de las proteínas de soja parece estar relacionada con su capacidad de unión a los ácidos biliares, mientras que las proteínas del suero de leche disminuyen los niveles de colesterol sérico actuando sobre su emulsión intestinal y, por tanto, disminuyendo su absorción.

I.3.8. Actividad antitrombótica.

La coagulación de la leche y la sangre presentan homologías funcionales y entre las secuencias de la cadena γ del fibrinógeno y la κ -caseína (Jollès y Caen, 1991). Así, los residuos 400-411 del dodecapéptido C-terminal de la cadena γ del fibrinógeno humano, y los residuos 106-116 del undecapéptido de la κ -caseína bovina son, estructural y funcionalmente, muy similares (Clare y Swaisgood, 2000).

En la coagulación de la leche con renina se genera caseinmacropéptido, un fragmento de la κ -caseína con capacidad antiagregante plaquetaria al inhibir la unión de la cadena γ del fibrinógeno a sus receptores en la superficie de las plaquetas (Fiat *et al.*, 1993).

Por otra parte, péptidos como el κ -caseinglicopéptido generado a partir de caseína ovina, o la casoplatelina obtenida de κ -caseína, también han mostrado capacidad de inhibir la agregación plaquetaria. En el caso del κ -caseinglicopéptido, éste inhibe la agregación inducida por colágeno y trombina, mientras que la casoplatelina, al igual que el caseinmacropéptido, inhibe la unión de la cadena γ del fibrinógeno a sus receptores en la superficie de las plaquetas (Jollès *et al.*, 1986; Qian *et al.*, 1995).

I.3.9. Actividad citomoduladora.

En la prevención de diferentes tipos de cáncer están implicadas tanto proteínas como péptidos y aminoácidos. De hecho, numerosos péptidos de diferentes tamaños y procedentes de diferentes fuentes han mostrado capacidad anticancerígena *in vitro* (Stiuso *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014a). En este sentido, tanto las proteínas lácteas como los péptidos que de ellas se derivan participan de este efecto preventivo e, incluso en el caso de los caseinfosfopéptidos, han mostrado actividad anticancerígena (Bouhallab y Bouglé, 2011).

Además estos péptidos lácteos también pueden actuar como citomoduladores (Gobbetti *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, los péptidos obtenidos de la fermentación microbiana de la caseína con cultivos de yogur son citomoduladores *in vitro* de las células Caco-2 (MacDonald *et al.*, 1994); los péptidos procedentes de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* de leche de vaca desnatada muestran actividad antiproliferativa en leucemia (Roy *et al.*, 1999); péptidos purificados procedentes de hidrólisis de caseína modulan proliferación y apoptosis en ensayos con cultivos celulares (Hartmann *et al.*, 2000); péptidos obtenidos de diferentes fracciones caseínicas inhiben el crecimiento de células cancerígenas y estimulan el crecimiento de células inmunocompetentes y de células intestinales en neonatos (Meisel y FitzGerald, 2003) y, finalmente, los fragmentos 1-18 y 105-117 de la β -caseína influyen en la viabilidad, proliferación, diferenciación y apoptosis de diferentes tipos de células (Phelan *et al.*, 2009).

Por otra parte, a partir de la carne de vacuno se obtienen dos péptidos citomoduladores: el péptido GFHI con acción citotóxica frente adenocarcinoma de mama y de estómago, y el péptido GLSDGEWQ, potente inhibidor de la proliferación celular en el adenocarcinoma de estómago (Jang *et al.*, 2008). A su vez, la hidrólisis de la carne de atún genera dos péptidos antiproliferativos frente al cáncer de mama: el péptido LPHVLTPEAGAT obtenido con papaína y el péptido PTAEGVYMT obtenido con proteasa XXIII (Hsu *et al.*, 2011). Estudios desarrollados han llevado a la obtención, mediante inducción hepatoesplénica seguida de inmunización con extracto protéico, de un péptido bioactivo con actividad antitumoral en cáncer de estómago sin efectos secundarios citotóxicos para el paciente (Su *et al.*, 2011,2014). En la misma línea, Yu *et al.* (2014a) obtuvieron un péptido (ACBP-3) a partir de hígado caprino con efecto anticancerígeno frente a células madre de cáncer gástrico.

I.3.10. Actividad antígenotóxica.

Park y Hyun han estudiado el potencial antígenotóxico de los hidrolizados de plasma bovino, globulinas y albúmina, indicando que la pepsina es la enzima más efectiva en la producción de péptidos antígenotóxicos, siendo los procedentes de albúmina sérica bovina los más potentes. El mecanismo de acción de estos péptidos se debe más a las modificaciones metabólicas y fisiológicas que

producen al interactuar con las células, que a la inactivación directa de sustancias carcinogénicas (Park y Hyun, 2002).

I.4. LA LECHE COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

La leche procedente de diferentes especies de rumiantes constituye, tanto directamente como en forma de productos derivados, un alimento de gran importancia para el ser humano a lo largo de su vida. Es fuente de macro y micronutrientes y contiene además compuestos activos que juegan un importante papel tanto por su valor nutricional como en la protección de la salud. (Haenlein, 2004).

La leche contiene aproximadamente un 3,5% de proteínas de las que un 80% son caseínas y el 20% restante proteínas de suero. Las caseínas se clasifican en tres tipos principales: α , β y κ ; y las proteínas del suero incluyen la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y una serie de proteínas menores con diferentes actividades biológicas: enzimas, inmunoglobulinas y proteínas quelantes de minerales. Asimismo, cada vez existe un mayor conocimiento acerca de las propiedades multifuncionales de los péptidos bioactivos obtenidos de la leche, ya que pueden tener un efecto positivo tanto a nivel fisiológico como metabólico (Kitts y Weiler, 2003).

I.4.1. Características diferenciales de la leche de vaca y cabra.

Las características físico-químicas de la leche relativas a su composición varían según la especie animal de procedencia (Park *et al.*, 2007). Hoy en día la leche de cabra despierta un interés particular debido a su composición específica que la lleva a ser considerada como una materia prima de alta calidad para la formulación de leches infantiles, así como para el consumo en adultos y ciertos sectores de la población con necesidades especiales (Haenlein, 2004; Park, 2006).

La comparación en cuanto a composición entre la leche de vaca y la leche de cabra ha sido analizada en varios trabajos (Sanz Ceballos, 2009; Haenlein, 2001, 2004; Park, 2006). Las estructuras micelares de la leche de vaca y cabra difieren en diámetro, hidratación y mineralización. Así, las micelas de caseína caprina contienen más calcio y fósforo inorgánico, están menos solvatadas, son menos

estables al calor y liberan la β -caseína más fácilmente que las micelas de caseína bovina (Park *et al.*, 2007). La proteína de leche de cabra es más digestiva (Haenlein, 2001, 2004; López-Aliga *et al.*, 2003) y al mismo tiempo es más tolerable y menos alergénica (Bevilacqua *et al.*, 2001; Sanz Ceballos, 2007; Lara-Villoslada *et al.*, 2004). De forma similar la grasa de la leche de cabra es más digestible (Alfárez *et al.*, 2001; Haelein, 2001) y podría ser considerada una fuente excelente de energía para su uso en diversos procesos metabólicos (Sanz Ceballos, 2007). Respecto a la composición de minerales (Tabla I.1) y su biodisponibilidad, la leche de cabra muestra una mayor calidad que la leche de vaca (Campos *et al.*, 2003; Haenlein, 2001).

Tabla I. 1. Composición (%) de la leche de vaca y la leche de cabra. (Adaptada de Sanz Ceballos *et al.*, 2009).

	Cabra	Vaca	Variación (%) (cabra vs. vaca)
Sólidos totales	13,57	11,36	+16,3
Proteínas	3,48	2,82	+19
Caseína	82,7	82,65	NS
α_{s1} -CN	18,92	30,8	-62,8
α_{s2} -CN	8,52	7,5	NS
β + κ -CN	55,26	44,35	+19,7
Proteínas del suero	17,3	17,35	NS
Grasa	5,23	3,42	+34,6
Cenizas	0,75	0,65	+13,3
Lactosa	4,11	4,47	-8,8

NS: Diferencias entre especies no significativas ($P>0,05$).

La composición en la fracción proteica de la leche de vaca y la leche de cabra presenta diferencias especialmente en la cantidad de α_{s1} -caseína, que es mucho menor en la leche de cabra (62,8%). El perfil aminoacídico revela ciertas diferencias y si consideramos el contenido de aminoácidos por gramo de leche, exceptuando la Tyr y la Ser donde no hay diferencias significativas entre especies, el resto de aminoácidos se presentan en mayor cantidad en la leche cabra en comparación con la leche de vaca (Tabla I.2). La composición de la grasa varía

principalmente en el contenido de ácidos grasos de cadena media (C6-C14), que son más abundantes en la leche de cabra (28,8%). Lo mismo ocurre con los ácidos grasos n-6, n-3 poliinsaturados y el total de ácido conjugado linoleico (10%, 51% y 33,8%, respectivamente más abundantes en la leche de cabra). Las cantidades de Ca, P, Mg y Cu son mayores en la leche de cabra (17,4, 15,6 16,3 y 66,6%, respectivamente) en comparación con la leche de vaca (Sanz Ceballos *et al.*, 2009).

Tabla I. 2. Composición en aminoácidos (mg/100g de leche) de la leche de cabra y la leche de vaca. (Adaptado de Sanz Ceballos *et al.*, 2009).

	Cabra	Vaca	Variación (%) (cabra vs. vaca)
Thr	138,67	115,81	16,5
Ileu	160,54	128,04	20,2
Leu	341,01	266,23	21,9
Lys	342,86	252,59	26,3
Met	77,95	71,15	8,7
Cys	30,62	23,2	24,2
Phe	175,45	133,51	23,9
Tyr	162,51	159,99	NS
Val	210,23	147,84	29,7
Arg	135,65	114,44	15,6
His	122,73	93,06	24,2
Ala	117,95	96,09	18,5
Asp	250,15	214,22	14,4
Glu	694,58	554,3	20,2
Gly	55,83	49,24	11,8
Pro	310,61	253,38	18,4
Ser	152,65	147,85	NS
Total	3479,99	2820,94	18,94

NS: Diferencias entre especies no significativas ($P > 0,05$).

I.4.2. Efectos de la pasteurización.

Debido a la vida útil relativamente corta de la leche, los tratamientos térmicos como la pasteurización son utilizados para preservar su calidad y extender su vida útil de varios días a semanas, destruyendo a los microorganismos alterantes y enzimas causantes de su deterioro temprano, además de destruir los posibles microorganismos patógenos que pudieran estar

presentes como *Brucella abortis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii* (Fellows, 2009).

La pasteurización es un tratamiento térmico relativamente suave en el cual el alimento requiere un calentamiento a temperaturas por debajo de los 100°C, y su posterior rápido enfriamiento sin que se produzca un cambio de fase. Dado que algunos microorganismos alterantes son más resistentes al calor y podrían no ser destruidos en este proceso, la leche pasteurizada, debe ser conservada en condiciones de refrigeración para mantener la vida útil requerida (Fellows, 2009; Tunick *et al.*, 2016).

La pasteurización de la leche mediante calentamiento a 72-74°C durante 15 segundos (HTST) (FDA, 2013) seguida de un rápido enfriamiento hasta los 3-7°C, o tratamientos similares, destruye los microorganismos patógenos y muchos de los microorganismos alterantes, y es el tratamiento térmico más importante aplicado a leche destinada a elaboración de queso para asegurar su seguridad y calidad (Trujillo, 2002).

Cuando se calienta la leche por encima de 60°C las proteínas del suero son desnaturalizadas. Es conocido que estas proteínas del suero (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina) desnaturalizadas se asocian a las micelas de caseína mediante puentes disulfuro, produciéndose principalmente la unión entre la β -lactoglobulina y la κ -caseína (Anema y McKenna, 1996; Dalglish y Blanks, 1991; Dannenberg y Kessler, 1988; Parnell-Clunies *et al.*, 1988). También se ha observado la formación de complejos entre proteínas que contienen Cys presentes de las membranas de los glóbulos grasos de la leche y la β -lactoglobulina a través de puentes disulfuro (Kim y Jiménez-Flores, 1995).

En la leche entera, la grasa está presente en forma de glóbulos que se encuentran rodeados por una membrana cuyos componentes principales son fosfolípidos y proteínas. Durante el tratamiento térmico se produce la ruptura de las interacciones entre los constituyentes de la membrana (Mulder y Walstra, 1974; McPherson *et al.*, 1984). Las imágenes con microscopio electrónico muestran que los glóbulos grasos sometidos a calentamiento se caracterizan por la aparición de gruesos depósitos de lo que parece ser proteínas de membrana (Mulder y Walstra, 1974). En general, la intensidad de las interacciones de las proteínas del suero con la membrana de los glóbulos grasos de la leche está afectada por la

temperatura y las condiciones de calentamiento (McPherson *et al.*, 1984; Van Boekel y Folkerts, 1991).

Así, un factor a tener en cuenta es que el calentamiento se produzca en continuo o discontinuo. El calentamiento en discontinuo de la leche entera no homogeneizada entre los 65 y 75°C muestra la unión entre la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina a las proteínas de la membrana del glóbulo graso, independientemente de la duración del tratamiento. Con el calentamiento de la leche a 85°C, la β -lactoglobulina se une preferentemente a las proteínas de las membranas de los glóbulos grasos con una débil unión micelar y una adsorción mayoritaria de la κ -caseína a la membrana del glóbulo graso. En las muestras de leche sometidas a tratamientos de HTST o UHT, la β -lactoglobulina se une a la membrana de los glóbulos grasos más que la α -lactoalbúmina, lo que es atribuido a las diferencias en temperatura y al uso de estos métodos en continuo (Tunick *et al.*, 2016).

I.4.3. Efectos de la congelación.

Dado que un problema considerable en la producción de leche de cabra es su carácter estacional, se ha propuesto la congelación de la misma como una de las posibles soluciones a esta cuestión (Gomes *et al.*, 1997). La congelación puede ser un proceso de fácil implementación y puede llegar a extender la vida útil incluso en años. En dicho proceso, la calidad del producto se ve menos afectada a velocidades rápidas de congelación debido a la formación de cristales de tamaño más pequeño (Smith y Stratton, 2007). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la temperatura condiciona la estructura de los glóbulos grasos en la emulsión, lo que afecta a propiedades tales como la viscosidad y la estabilidad. Algunas emulsiones se convierten en inestables tras un proceso de congelación y descongelación (McClements, 2004).

La leche empieza a congelarse a una temperatura aproximada de -0,54°C. Cuando la temperatura desciende a los -23°C, las fracciones no congeladas se encuentran en estado cristalino. En estas condiciones, la leche permanece casi sin alteraciones como consecuencia de la baja temperatura pero todavía puede producirse la autooxidación de los lípidos. Tras la congelación y descongelación de la leche se forman agregados micelares debido a la desmineralización de la

caseína. Mediante agitación es posible la redispersión parcial de la caseína ya que el fosfato cálcico micelar experimenta una serie de cambios irreversibles que impiden la redispersión total. La agregación totalmente reversible se consigue mediante la rápida congelación de la leche por debajo de los -23°C . En estas condiciones de congelación se evita la cristalización de la lactosa, permitiendo la coagulación reversible de la caseína. El proceso de congelación y descongelación de la leche produce que los glóbulos grasos se agreguen, debido al daño mecánico producido en los glóbulos grasos por los cristales de hielo formados. Para reducir la inestabilidad de la emulsión grasa se puede optar por un proceso de homogenización previo a una congelación rápida (Walstra *et al.*, 2001).

Gomes *et al.* (1997) observaron que el almacenamiento de la leche congelada a -18°C durante 90 días no alteraba sus características químicas y microbiológicas, pero modificaba las propiedades sensoriales y aumentaba su acidez. Estos resultados podrían explicarse porque estos autores pasteurizaban la leche antes de su congelación. Ambos procesos dan lugar a la precipitación del fosfato cálcico (Goff *et al.*, 1996; Salaün *et al.*, 2005).

I.4.4. Proteólisis.

La actividad de los péptidos se basa en su composición en aminoácidos así como en la secuencia de estos en la molécula. El tamaño de los péptidos bioactivos está comprendido mayoritariamente entre 2 y 20 aminoácidos (Meisel y FitzGerald, 2003).

Existen proteasas, como la plasmina láctea, que se encuentran de forma natural en los alimentos e hidrolizan las proteínas liberando péptidos bioactivos durante la producción o el almacenamiento del producto alimenticio. Asimismo, los microorganismos utilizados en industria y los existentes en la flora intestinal poseen enzimas capaces de producir péptidos bioactivos. El queso, por ejemplo, contiene fosfopéptidos que se hidrolizan durante la maduración del mismo generando péptidos inhibidores de la ECA (Saito *et al.*, 2000).

Los péptidos bioactivos de la leche pueden liberarse de la proteína precursora por tres vías: hidrólisis con enzimas digestivas, hidrólisis por fermentación microbiana e hidrólisis con proteasas microbianas (Jauhiainen y Korpela, 2007; Korhonen y Pihlanto, 2003). Una vez liberados, estos péptidos

presentan una amplia gama de actividades biológicas: cardiovascular, digestiva, endocrina, inmune, etc. Es precisamente esta versatilidad de los péptidos lácteos la que ha atraído el interés de la industria y los investigadores sobre su potencial uso como ingrediente funcional en la formulación de alimentos funcionales, nutracéuticos y otros productos farmacéuticos (Korhonen y Pihlanto, 2003; Meisel y FitzGerald, 2003).

1.4.4.1. Digestión gastrointestinal in vivo:

La digestión gastrointestinal permite la hidrólisis de las proteínas de la leche mediante las enzimas que encontramos en el intestino delgado: pepsina, tripsina y quimotripsina (Korhonen y Pihlanto, 2003). Estas proteínas (caseínas y proteínas del suero) se desnaturalizan previamente en presencia del ácido clorhídrico segregado por las células parietales del estómago para posteriormente se hidrolizadas liberando péptidos bioactivos (FitzGerald *et al.*, 2004; Gobetti *et al.*, 2002, 2004; Meisel y FitzGerald, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

Otras proteasas como alcalasa o termolisina, que se han utilizado conjuntamente con pepsina y quimotripsina para emular la digestión gastrointestinal, también han mostrado capacidad de generar péptidos quelantes de calcio (McDonagh y FitzGerald, 1998), inhibidores de la ECA (Vermeirssen *et al.*, 2004), antibacterianos (Mohantye *et al.*, 2014), antioxidantes (Suetsuna *et al.*, 2000), inmunomoduladores (Gauthier *et al.*, 2006a) y péptidos opioides (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1994; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1996) a partir de la leche.

1.4.4.2. Fermentación microbiana in vitro:

Algunas bacterias lácticas como *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus helveticus* han demostrado su capacidad para producir péptidos bioactivos mediante fermentación (ver Tabla I.3). Esta capacidad se basa en la presencia intracelular en estas bacterias de una serie de peptidasas: endopeptidasas, aminopeptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas (Christensen *et al.*, 1999).

Tabla I. 3. Péptidos bioactivos obtenidos de proteínas lácteas por fermentación (adaptado de Mohanty *et al.*, 2016).

Microorganismo	Proteína precursora	Secuencia peptídica	Bioactividad
<i>L. rhamnosus</i>	β -caseína	DKIHPF YQEPVL	Inhibidores ECA
<i>L. helveticus</i>	β -caseína, κ -caseína	VPP IPP	Inhibidores ECA
<i>Lactobacillus GG</i>	β -caseína α_{s1} -caseína	YPPF AVPYPQR TTMPLW	Inhibidores ECA, opioides, inmunoestimuladores
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	κ -caseína	ARHPHPHLSFM	Antioxidante
<i>K. marxianus</i>	β -lactoglobulina	YLLF	Inhibidor ECA
<i>L. helveticus</i>	β -caseína	KVLPVPE	Inhibidor ECA

I.4.5. Actividad de los péptidos derivados de la leche.

I.4.5.1. Péptidos antihipertensivos:

Como ya se ha comentado la ECA es una dipeptidilpeptidasa que transforma la angiotensina I en angiotensina II; esta última estimula la liberación de aldosterona, provocando un aumento de los niveles de sodio y, consecuentemente, un aumento de la presión arterial. La actividad antihipertensiva de los péptidos se basa en la inhibición de esta enzima (Korhonen y Pihlanto, 2007).

Estos péptidos inhibidores, principalmente aislados de caseínas bovina y humana, son dipéptidos o tripéptidos que contienen Pro, Lys o Arg en su extremo C-terminal. De hecho, los péptidos del suero lácteo producidos por fermentación con bacterias lácticas como *Lactobacillus helveticus* o *Lactococcus lactis* son resistentes a las endopeptidasas presentes en el tracto digestivo, pudiendo absorberse fácilmente hacia el torrente sanguíneo (Saito *et al.*, 2000).

Así, han mostrado capacidad antihipertensiva las fracciones β y κ obtenidas de α_{s1} -caseína y β -caseína (Bracquart y Lorient, 1979), los péptidos α -lactorfina y β -lactorfina procedentes de la α -lactalbúmina y lactoglobulina, respectivamente, (Maruyama *et al.*, 1987; Maruyama *et al.*, 1985; Maruyama y Suzuki, 1982) y los péptidos EMPFPK y YPVEPFTE obtenidos de las fracciones caseínicas f(108-113) y f(114-121), respectivamente (Perpetuo *et al.*, 2003).

El uso de los péptidos inhibidores de la ECA obtenidos de proteínas alimentarias permitiría la disminución de las dosis de antihipertensivos de síntesis, con la consiguiente disminución de efectos secundarios.

1.4.5.2. Péptidos antioxidantes:

Algunos péptidos lácteos participan en la regulación del metabolismo oxidativo, que es esencial para la supervivencia de la célula aunque, como efecto colateral, genera radicales libres. Cuando los radicales libres se encuentran en exceso provocan la oxidación de proteínas celulares de la membrana lipídica, del ADN y de enzimas. Estas oxidaciones provocan tanto la interrupción de la respiración celular como la producción de lesiones que pueden derivar en arteriosclerosis, diabetes, artritis reumatoide o cáncer (Abuja y Albertini, 2001; Halliwell, 2000; Halliwell y Whiteman, 2004).

Los péptidos lácteos antioxidantes contienen entre 5 y 11 aminoácidos hidrofóbicos (Pro, His, Tyr o Trp) (Korhonen y Pihlanto, 2003) y pueden actuar captando radicales libres o previniendo la formación de los mismos (Cervato *et al.*, 1999; Wong y Kitts, 2003). Destacan en particular los péptidos antioxidantes obtenidos de la caseína, que capturan radicales e impiden la peroxidación lipídica tanto enzimática como no enzimática (Rival *et al.*, 2001a; Suetsuna *et al.*, 2000).

Las investigaciones llevadas a cabo sobre los antioxidantes artificiales revelan que, junto a su potente capacidad antioxidante, también muestran importantes efectos secundarios sobre la salud. Este hecho ha provocado que su uso se haya restringido en diferentes países al tiempo que la investigación se ha centrado en la obtención de antioxidantes a partir de fuentes naturales (Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000; Okada y Okada, 1998).

1.4.5.3. Péptidos antimicrobianos:

Los péptidos obtenidos de proteínas lácticas han demostrado capacidad tanto de control de diferentes infecciones microbianas como de inhibición de patógenos Gram positivos y Gram negativos entre los que se encuentran: *Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella typhimurium* SB300, *Salmonella enteritidis* 125109 y *Staphylococcus aureus* MTCC96 (Mohanty *et al.*, 2014).

De forma similar la hidrólisis de caseína con quimosina genera caseidina, un péptido con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes* (Lahov y Regelson, 1996). Asimismo, de la caseína también se han obtenido la casocidina-I, capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Zucht *et al.*, 1995) y dos péptidos (f183-207 y f164-179) capaces de inhibir patógenos (Recio y Visser, 1999). Además, mediante la digestión con quimosina y tripsina de la α_2 -caseína bovina se obtuvo Isracidina, péptido con una potente actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes* (Lahov y Regelson, 1996).

Finalmente, la hidrólisis de la caseína con quimosina genera glicomacropéptido, que presenta efecto modulador sobre la flora intestinal (Manso y López-Fandiño, 2004), y caseinmacropéptido, que muestra actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli* (Farrell *et al.*, 2004).

Por otro lado a partir de lactoferrina se puede obtener un fragmento, la lactoferrampina con actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Van der Kraan *et al.*, 2005) así como isracidina y lactoferricina B activos frente a *Candida albicans* (Bellamy *et al.*, 1993; Lahov y Regelson, 1996). La lactoferricina y sus derivados, además, muestran actividad *in vitro* frente a varios patógenos: *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, virus de la hepatitis B, C y G, VIH-1, poliovirus, rotavirus y virus del herpes simple (Farnaud y Evans, 2003; Pan *et al.*, 2007).

1.4.5.4. Péptidos inmunomoduladores:

Diferentes glicopéptidos, hormonas y fragmentos de las inmunoglobulinas se consideran péptidos inmunomoduladores capaces de regular la respuesta inmune tanto celular como humoral. A este grupo de añadieron más tarde una serie de péptidos procedentes de las fracciones f(63-680) y f(191-193) de la β -caseína bovina capaces de influir sobre los fagocitos (Migliore-Samour y Jollès, 1988). En esta línea, diferentes estudios indican que péptidos obtenidos de caseínas y proteínas de suero lácteo son capaces de influir en la estimulación y proliferación de linfocitos, en la actividad fagocítica de los macrófagos y en la síntesis de anticuerpos y citoquinas (Clare *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2000). Finalmente,

la caseína también rinde péptidos citomoduladores, que podrían inhibir el crecimiento de células tumorales al activar la respuesta inmunitaria celular (Meisel y FitzGerald, 2003).

Por otra parte, el glicomacropéptido y sus derivados también han mostrado capacidad inmunomoduladoras, fundamentalmente en su capacidad de suprimir la producción de inmunoglobulina G (Manso y López-Fandiño, 2004; Monnai *et al.*, 1998). La lactoferricina B procedente de la digestión de la lactoferrina se une a los neutrófilos produciendo un efecto similar a las opsoninas, mientras que los péptidos obtenidos de κ -caseína y α -lactoalbúmina se están utilizando en la inmunoterapia del VIH (Hadden, 1991).

1.4.5.5. Péptidos opioides:

Los péptidos opioides son ligandos de receptores opioides que encontramos en los sistemas endocrino, nervioso e inmune, así como en el tracto gastrointestinal. También encontramos péptidos opioides encriptados en las β -caseínas humana y bovina (Brantl, 1984). Estos péptidos interactúan tanto con los ligandos endógenos y exógenos de los receptores opioides como con los antagonistas de los mismos pudiendo influir en la regulación nerviosa (central y periférica) provocando hipotensión, anorexia, fluctuaciones de la temperatura corporal o alteraciones del comportamiento sexual (Dziuba *et al.*, 1999; Molina y Abumrad, 1994).

Los péptidos agonistas de opioides endógenos pueden regular el crecimiento y función de las células del sistema nervioso central; por ejemplo las β -caseomorfinas, que se absorben a través de las membranas mucosas de los neonatos, pueden regular determinadas respuestas fisiológicas, que resultan en la relajación e inducción del sueño en los recién nacidos (Calvo *et al.*, 2000; Sturner y Chang, 1988). Además las β -caseomorfinas interactúan con los receptores opioides de la capa serosa del epitelio intestinal, influyendo en funciones como el transporte de electrolitos, la secreción de insulina y la absorción de nutrientes (Tomé y Debabbi, 1998).

Los antagonistas opioides son capaces de suprimir la actividad agonista de la encefalina. Los dos antagonistas opioides conocidos más efectivos, la serorfina y la casoxina C, han sido aislados de albúmina sérica bovina y κ -caseína bovina respectivamente (Meisel y FitzGerald, 2000). Las casoxinas bovinas A y B también

actúan como antagonistas opioides, pero con menor potencia que la caseoxina C (Meisel, 1998; Xu, 1998).

Finalmente, diferentes estudios indican que las caseomorfinas, como ligandos de receptores opioides, poseen actividad antisecretora (Daniel *et al.*, 1990), analgésica (Matthies *et al.*, 1984) y estimulante de la secreción de insulina y somatostatina (Meisel y Schlimme, 1990).

I.5. BIOPÉPTIDOS DERIVADOS DEL HUEVO

Desde la antigüedad el huevo es uno de los alimentos más consumidos ya que aporta una mezcla equilibrada de nutrientes esenciales fáciles de digerir (Surai y Sparks, 2001); además, está considerado como una fuente proteica de gran valor (Miguel *et al.*, 2004). Las proteínas del huevo se localizan tanto en la clara como en la yema, y algunas se encuentran conjugadas con lípidos o carbohidratos (Offengenden *et al.*, 2011; Omana *et al.*, 2010).

Estas proteínas y los péptidos que de ellas se derivan han mostrado bioactividad tanto de forma directa, por su presencia en los alimentos, como de forma indirecta al liberarse durante la hidrólisis digestiva (Hartmann y Meisel, 2007). Es por ello que el estudio de las funciones biológicas de las proteínas y los péptidos derivados del huevo cobran un gran interés.

Las principales proteínas bioactivas derivadas del huevo son: ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucina, ovomucoide, lisozima, avidina, cistatina, ovoinhibidor, lipoproteína y glicoproteína; las cuales han mostrado actividad antibacteriana, antihipertensiva, inmunomoduladora y antiadhesiva entre otras (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). A su vez, la hidrólisis de estas proteínas genera péptidos antihipertensivos (Liu *et al.*, 2010; Miguel y Aleixandre, 2006; Yu *et al.*, 2011b), antioxidantes (Dávalos *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010b; You *et al.*, 2010), antidiabéticos (Yu *et al.*, 2011a) y anticancerígenos (Yi *et al.*, 2003).

Existe un creciente interés comercial en la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de huevo que pueden obtenerse mediante hidrólisis enzimática *in vitro* (Figura I.9).

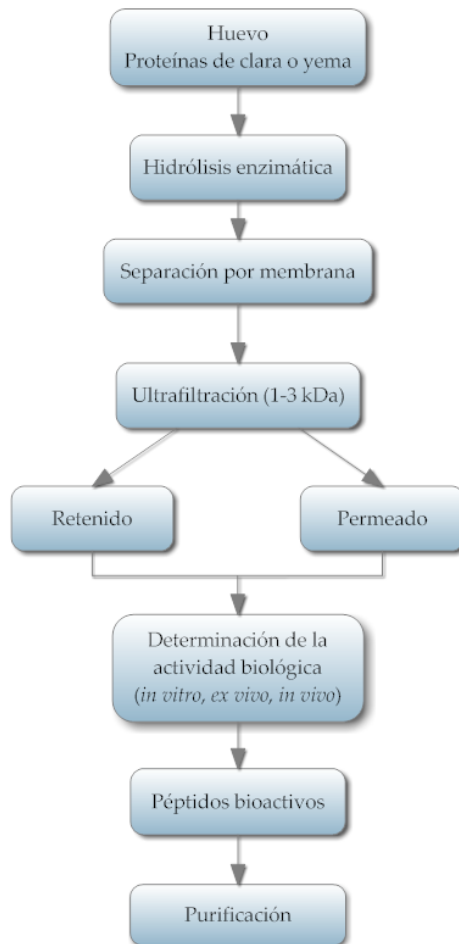


Figura I. 9. Producción y purificación de péptidos bioactivos de huevo (adaptado de Mine, 2007).

Las diferentes técnicas de separación por membrana son una herramienta muy potente en el proceso de separación/purificación de péptidos (Pouliot *et al.*, 2006). Así la separación por membrana se puede utilizar como paso preliminar para la eliminación de las enzimas y las proteínas no hidrolizadas además de para el fraccionamiento de mezclas de péptidos y la purificación de los mismos.

I.5.1. Actividad de los péptidos derivados del huevo.

I.5.1.1. Péptidos antihipertensivos:

Las precursoras de los péptidos antihipertensivos se encuentran predominantemente en la albúmina del huevo (Miguel y Alexandre, 2006; Hartman y Miesel, 2007).

Se ha despertado un gran interés en la investigación de los péptidos con actividad biológica generados de la ovoalbúmina, proteína mayoritaria de la clara de huevo. Cuando el huevo es digerido, la ovoalbúmina se transforma por la acción de la pepsina en un octapéptido, la ovoquinina, cuya secuencia FRADHPFL corresponde con los residuos 358-365 de la ovoalbúmina.

La ovoquinina fue el primer péptido obtenido a partir de clara de huevo (Fujita *et al.*, 1995a, 1995b). Adicionalmente, bajo la acción de la quimotripsina se libera la ovokinina (2-7) (Matoba, 1999). Estos péptidos actúan bajando la presión sanguínea sistólica en ratas de manera dosis-dependiente (Fujita *et al.*, 1995). En el sistema digestivo, estos péptidos se emulsionan inmediatamente y son absorbidos en el intestino (Davis y Reeves, 2002).

Desde estos primeros estudios, se han aislado diferentes péptidos con actividad inhibitoria de la ECA a partir de proteínas del huevo como: RADHPLF (Matoba *et al.*, 1999), RADHPFL y YAEERYPIL (Miguel *et al.*, 2004), IVF (Miguel, *et al.*, 2005), RADHP e YPI (Miguel *et al.*, 2007a), RVPSL (Liu *et al.*, 2010), IQW IRW y LKP (Majumder y Wu, 2010, 2011) y QIGLF (Yu *et al.*, 2011b).

Para determinar la efectividad de los diferentes péptidos inhibidores de la ECA se utiliza el valor de concentración IC_{50} ; no obstante en el caso de los péptidos de cadena larga con potente actividad inhibidora de la ECA, pero susceptibles de digestión gastrointestinal, su actividad *in vitro* no siempre se corresponde con la actividad mostrada *in vivo*. Esta discrepancia ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios de estructura-actividad en estos péptidos (Wu y Aluko, 2007; Wu *et al.*, 2006).

I.5.1.2. Péptidos antioxidantes:

Los hidrolizados de proteína de huevo han mostrado actividad antioxidante capaz de prevenir la peroxidación, enzimática y no enzimática, de los ácidos

grasos esenciales (Huang *et al.*, 2010a; Mine, 2007). Por ejemplo, dos péptidos con residuos aromáticos que se obtuvieron de la hidrólisis de proteína de yema de huevo con alcalasa tienen el potencial de inhibir la oxidación del ácido linoleico (Park *et al.*, 2001). Esta actividad también se ha atribuido a los péptidos YAEERYPIL, KIVSDGNGMNAW, RNTDGSTDYGIL, VSDGNGM y KIVSDGNGM (Dávalos *et al.*, 2004; Nimalaratne *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2007; You *et al.*, 2010; You y Wu, 2011). La ovoalbúmina da lugar a tres péptidos antioxidantes que contienen en su secuencia el aminoácido His en la segunda posición (Tsuge *et al.*, 1991). Un rango característico de estos péptidos es la presencia del residuo Leu en la posición N-terminal (Park *et al.*, 2001). Un efecto similar tienen los hidrolizados de yema de huevo obtenidos por la acción de las enzimas bacterianas proteolíticas de *Bacillus* spp., dando lugar a una fracción de péptidos de bajo peso molecular (1kDa) (Sakanaka *et al.*, 2004).

Otros péptidos con actividad antioxidante son los productos de la hidrólisis de la ovoalbúmina con pepsina, los cuales tienen la capacidad de captar el radical libre AAPH (Dávalos *et al.*, 2004); o también los obtenidos a partir de la fosvitina, una glicoproteína altamente fosforilada siendo la fosfoproteína más abundante de la yema de huevo. Estos péptidos derivados de la fosvitina se caracterizan por un alto contenido en fósforo y en aminoácidos como la His, la Met y la Tyr (Xu *et al.*, 2007). También se ha descrito que los productos de la fosvitina inhiben la formación de radicales libres hidroxilo dependiente de iones de hierro, y de esta forma ejercen un efecto protector sobre el ADN (Matoba *et al.*, 1999).

1.5.1.3. Péptidos antimicrobianos.

El huevo contiene varias proteínas con actividad antimicrobiana, como la lisozima o la ovotransferrina, que se utilizan como antimicrobianos alimentarios de amplio espectro (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005; Mine, 2007; Mine *et al.*, 2004). Los péptidos antimicrobianos naturales del huevo se localizan en diferentes compartimentos del huevo: cáscara, albumen y membrana vitelina (Abdou *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2009; Hervé-Grépinet *et al.*, 2010; Mine *et al.*, 2004; Thammasirirak *et al.*, 2010); siendo la mayoría de ellos catiónicos o anfipáticos aunque también existen péptidos hidrofóbicos α -helicoidales con capacidad antimicrobiana (Erand y Vogel, 1999).

La ovoalbúmina ha demostrado ser precursora de péptidos con actividad antimicrobiana. Se ha utilizado la tripsina bovina para la digestión de esta proteína y obtener penta, hexa y octapéptidos que muestran actividad bactericida frente a *Bacillus subtilis*. Por otro lado, los péptidos formados por la acción de la quimotripsina bovina han demostrado actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas, como *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermitis* o *Streptococcus zooepidermicus*, y frente a bacterias Gram negativas como *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Serratia marcesens*, así como frente a hongos como *Candida albicans* (Pellegrini *et al.*, 2004).

El fragmento (f109-200) de 9,9 kDa de la conalbúmina (OTAP 92) es activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. El péptido OTAP 92 obtenido del fragmento N-terminal es de naturaleza catiónica y además, ha mostrado propiedades antivíricas siendo efectivo en la inactivación del virus de la enfermedad de Marek en gallinas (Eckert *et al.*, 2013)

La lisozima es otra proteína del huevo precursora de péptidos antimicrobianos. Su hidrólisis parcial con pepsina da lugar a péptidos con actividad antimicrobiana frente al género *Bacillus*. Estos péptidos mantienen su actividad incluso después de 30 minutos sometidos a 95°C en un rango de pH entre 4.5 y 7, lo que les hace adecuados para su uso como conservantes en alimentos procesados (Abdou *et al.*, 2007).

1.5.1.4. Péptidos quelantes de minerales:

Los fosfopéptidos contienen agrupaciones de fosfoserinas que les permiten unirse al calcio e inhibir la formación de fosfatos de calcio insolubles; de esta forma se produce un incremento en la biodisponibilidad de este mineral (Jiang y Mine, 2000, 2001; Feng y Mine, 2006). Esta capacidad convierte a este grupo de péptidos en candidatos a ingredientes funcionales (Yu *et al.*, 2014b).

La fosvitina es una proteína muy fosforilada con un peso molecular cercano a los 35 kDa que contiene un 55% de residuos de Ser (Young *et al.*, 2011). Contiene más residuos de Ser que la caseína, y además, el alto contenido en fósforo le otorga propiedades biológicas específicas. Su estructura primaria única la convierte en uno de los quelantes minerales más potentes; asimismo, los fosfopéptidos derivados de la hidrólisis de la fosvitina han demostrado capacidad

quelante del calcio (Feng y Mine, 2006; Jiang y Mine, 2000, 2001). Se ha probado que los péptidos obtenidos de la fosfovitina aumentan la absorción del calcio en ratas (Choi *et al.*, 2005). Otros estudios han mostrado que cuando estos péptidos son obtenidos mediante la hidrólisis con tripsina, se ve aumentada la unión del calcio a los huesos y se previene la formación de fosfato cálcico insoluble (Jiang y Mine, 2001).

En conclusión, los fosfopéptidos derivados de la fosfovitina que contienen una gran cantidad de fosfoserina pueden ser ampliamente utilizados como suplementos nutricionales o en preparaciones farmacológicas para personas que sufren osteoporosis. Los péptidos con actividad quelante, por su actividad protectora en el organismo de la formación de radicales libres podrían también mejorar el desarrollo de la actividad física y mental así como ralentizar el envejecimiento en humanos (Hartman y Miesel, 2007).

1.5.1.5. Actividad antitumoral.

Se han mostrado evidencias del beneficio del consumo de péptidos en el caso de la producción de neoplasias (Erdmann *et al.*, 2008). Los estudios epidemiológicos muestran que la incidencia de tumores en diferentes partes del sistema digestivo está fuertemente condicionada por la dieta (Rose *et al.*, 2007). Varios estudios han mostrado que el riesgo del cáncer colorectal podría verse disminuido por la influencia de hidrolizados de proteína de yema de huevo (Azuma *et al.*, 2000; Belobrajdic *et al.*, 2003) ya que su ingestión en ratas inhibía la proliferación de células tumorales de colon.

Se ha atribuido a la fosvitina un efecto protector específico frente a la proliferación de células cancerígenas debido a que esta proteína y sus péptidos han mostrado gran actividad antioxidante *in vitro* (Ishikawa *et al.*, 2004) y en el epitelio intestinal humano (Katayama *et al.*, 2006). Además, estos péptidos regulan el nivel de enzimas responsables de la biosíntesis del glutatión (GSH) que juega un papel principal en el mecanismo de muerte celular (Richman y Meister, 1975). Los estudios muestran que los oligopéptidos liberados de la fosvitina tienen la capacidad de aumentar la actividad intracelular del glutatión (GSH) y regulan la expresión de γ -glutamil cisteína en el epitelio de las células intestinales, que cataliza la síntesis de GSH (Katayama *et al.*, 2006, 2007). Los fosfo-oligopéptidos derivados de la fosvitina también tienen la capacidad de regular los

niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión reductasa. Por este motivo estos péptidos pueden ser considerados como agentes anticancerígenos en el colon (Eckert *et al.*, 2013).

La ovomucina es precursora de péptidos anticancerígenos. La acción de la enzima pronasa de *Streptomyces griseus* sobre las fracciones α y β de la proteína, libera oligopéptidos altamente glicosilados con masas de 220 (f β), 120 (f β) y 70 (f α) kDa. El tratamiento directo con estos oligopéptidos en ratones con tumores inhibió eficazmente el crecimiento tumoral (Watanabe *et al.*, 1998).

I.6. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ALCACHOFA

España es el tercer productor a nivel mundial de alcachofa con una producción anual de 234.091 toneladas según los últimos datos publicados correspondientes al año 2014 por la división de Estadística de la FAO (Figura I.10). Italia se coloca en primer lugar registrando una producción de 451.461 toneladas anuales, seguida de Egipto con una producción de 266.196 toneladas (FAOStat, 2017d).

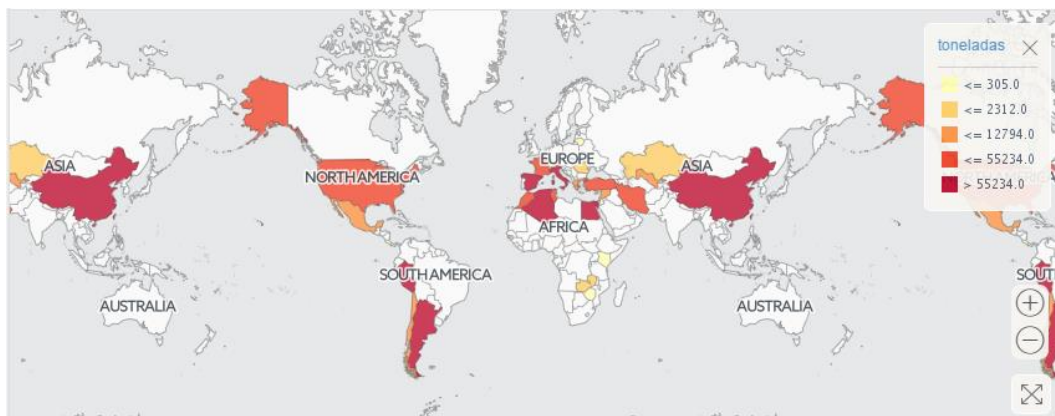


Figura I. 10. Producción de alcachofa a nivel mundial (toneladas) en el año 2014. (Fuente: FAOStat, 2017a).

En cuanto al comercio exterior España es el principal país exportador con 14.081 toneladas en 2013 según datos de la FAO, suponiendo un valor de exportación de 22.758.000 dólares en este mismo año, seguido de Francia, Egipto e Italia (FAOStat, 2017e).

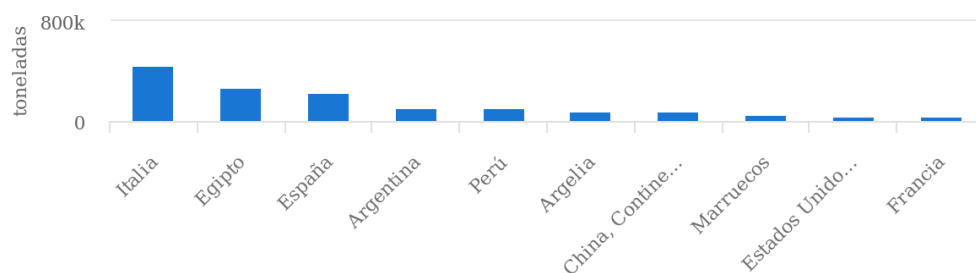


Figura I. 11. Los diez principales productores de alcachofa a nivel mundial en el año 2014 (Fuente: FAOStat, 2017d).

En España se dedican 17.428 ha al cultivo de la alcachofa, con un rendimiento medio de 134.319 hg/ha, según datos del año 2014, con un precio al productor, según datos del año 2015, de 651,1 euros por tonelada. (FAOStat, 2017b, 2017c). A pesar de que su producción disminuyó de forma progresiva y sostenida a lo largo de los años noventa y primera década del 2000, a partir del año 2010 con 166.700 toneladas anuales, la producción de la alcachofa ha seguido una tendencia al alza hasta alcanzar los 213.258 de toneladas en el año 2014 (último con año con estadísticas de producción anual disponibles) (MAPAMA, 2017b).

A nivel nacional, la Región de Murcia es la mayor productora de alcachofa con 90.280 toneladas producidas en el año 2014, lo que supone el 42,33% de la producción nacional (Figura I.12). Le sigue la Comunidad Valenciana con 62.790 toneladas (29,44%). Aproximadamente el 60% de la producción se destina a la industria y el 40% restante para su consumo en fresco, comercializándose un 75% de la producción en el mercado interior y destinándose un 25% a la exportación en el mercado comunitario. La producción de alcachofa para exportación se realiza casi exclusivamente en Murcia, empleándose variedades de tamaño grande y color violáceo, siendo estas características las más demandadas en el mercado exterior (predominantemente en Francia) (MAPAMA, 2017a).

A nivel de la Región de Murcia el sector de la agricultura ocupa a un 12,1% de la población activa, un porcentaje que casi triplica al del promedio nacional, donde sólo el 4,3% de los ocupados trabajan en este sector, según datos del 4º trimestre de 2015 recogidos en la Estadística Agraria de Murcia 2014-2015 (Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia).

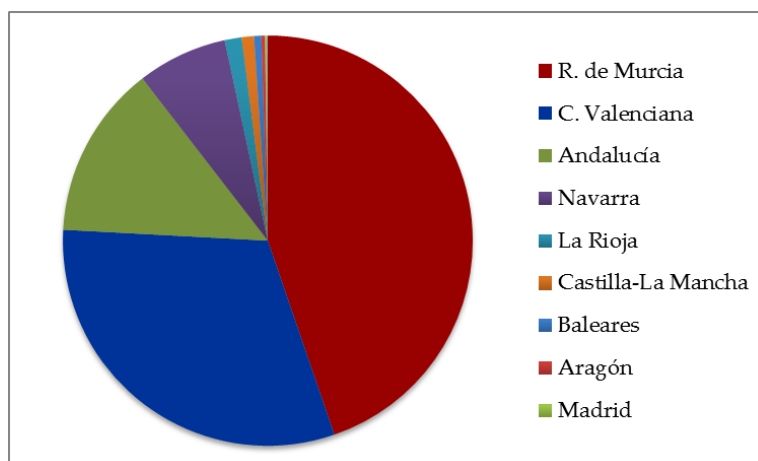


Figura I. 12. Diagrama de producción nacional a nivel de comunidades autónomas del año 2014. (Elaboración propia a partir del análisis provincial del MAPAMA del 2014).

I.6.1. Aprovechamiento de subproductos de la alcachofa.

La alcachofa tiene un importante valor nutritivo debido a su alto contenido en compuestos bioactivos como los polifenoles, fructooligosacáridos, fibras y minerales. La economía del cultivo de la alcachofa se centra principalmente en el mercado de las flores comestibles en fresco, congeladas o en producto enlatado (Lattanzio *et al.*, 2009).

En el procesado industrial de la alcachofa en lata se generan residuos sólidos constituidos por las partes externas de las flores tales como las brácteas y los tallos que representan aproximadamente el 70% del total de la flor de alcachofa (López-Molina *et al.*, 2005). Por otra parte, se generan aguas residuales tales como las aguas blanqueantes que no son aptas para el consumo humano. Estos residuos se usan generalmente como alimentación animal, para la producción de fibra o directamente se desechan. El tratamiento de estos residuos, en el cumplimiento de las leyes medioambientales, supone un costo adicional (Llorach *et al.*, 2002; Megías *et al.*, 1999).

El interés por la recuperación de compuestos apreciados de los subproductos generados de la agricultura y de la industria agroalimentaria va en aumento. Muchos ingredientes son recuperados de los desechos producidos, como el β -glucano obtenido a partir de los residuos del molido de la avena

(Patsioura *et al.*, 2011); proteínas y péptidos de la piel del tiburón azul (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011); polisacáridos de la piel de la granada (Zhu y Liu, 2013); oligosacáridos de la pectina y D-limoneno de la piel de cítricos (Gómez *et al.*, 2014; Lopestro *et al.*, 2014); proteínas y polifenoles del hueso de oliva (Roselló-Soto *et al.*, 2015); y otros.

En los últimos años y siguiendo una tendencia general hacia la reutilización de los desechos de la industria agraria (Mirabella *et al.*, 2014) se han realizado intentos para encontrar un modo de dar un valor añadido a los residuos de la alcachofa. La extracción de inulina de alto peso molecular (López-Molina *et al.*, 2005), la recuperación de la peroxidasa para eliminar la contaminación de los fenoles en las aguas residuales (Sergio *et al.*, 2010) y la producción de biocombustibles (Fabri *et al.*, 2014) son algunas de las propuestas a tener en consideración.

En la búsqueda de nuevas aplicaciones para los desechos de la alcachofa, se ha confirmado que contiene una gran cantidad de compuestos bioactivos. En diferentes estudios se ha demostrado su potencial efecto promotor de la salud, especialmente su efecto hepatoprotector (Adzet *et al.*, 1987), antioxidante (Gebhardt, 1997), anticarcinogénico (Clifford, 2000) e hipocolesterolémico (Clifford y Walker, 1987).

Las propiedades farmacológicas de la alcachofa están bien documentadas sobre estudios *in vivo* e *in vitro* para el tratamiento de disfunciones hepatobiliares, síndromes de dispepsias, enfermedades gástricas, así como en la inhibición de la biosíntesis del colesterol y la oxidación de lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL), agentes responsables de la arterioesclerosis y enfermedades coronarias (Latanzio *et al.*, 2009). Los extractos de las hojas de alcachofa disminuyen los lípidos séricos así como el estrés oxidativo hepático y cardíaco en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol (Kucukgergin *et al.*, 2010).

La actividad biológica de los subproductos de la alcachofa y en particular sus considerables efectos antioxidantes, están unidos a su composición química que incluye altos niveles de compuestos fenólicos con una gran variedad de derivados del ácido cafeoilquínico siendo el principal el ácido clorogénico, y flavonoides como apigenina-7-O-glucosido y luteolina (Abu-Reidah *et al.*, 2013; Christaki *et al.*, 2012; Mulinacci *et al.*, 2004; Negro *et al.*, 2012; Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003).

Además, las aguas residuales de la alcachofa contienen inulina, un carbohidrato vegetal que ha sido relacionado con la mejora del sistema inmune y gastrointestinal, aumentando la absorción de calcio y magnesio y reduciendo los niveles de colesterol y lípidos séricos (Niness, 1999; Saengkanuk *et al.*, 2011).

Debido a estas características, los subproductos de la alcachofa representan una fuente muy útil de compuestos de alto valor añadido de potencial interés como aditivos alimentarios o nutraceuticos (Ceccarelli *et al.*, 2010; Lattanzio *et al.*, 2009).

Otra aplicación potencial de los subproductos de la alcachofa es la obtención de extractos enzimáticos proteolíticos a partir de los estigmas de las flores. Dichos extractos en bruto, así como las cinarasas purificadas a partir de los mismos, se presentan como posibles catalizadores en los procesos de producción de péptidos bioactivos. En esta línea, los estudios de Silva *et al.* (2006) indican que la proteólisis de α_{s1} -caseína y β -caseína ovinas y caprinas con extracto enzimático de *C. cardunculus* L. genera péptidos tanto con actividad inhibidora de la ECA como antioxidantes.

La producción de estos componentes se puede llevar a cabo de acuerdo a la "Estrategia Universal de Recuperación" en cinco fases: pretratamiento macroscópico, separación de macro y micromoléculas, extracción, purificación y formación del producto (Galanakis, 2012; Galanakis y Schieber, 2014). Estos pasos permiten la recuperación de los compuestos y su reutilización como ingredientes en alimentos (Galanakis, 2013).

Se han ensayado diferentes métodos para obtención de extractos purificados con compuestos fenólicos de subproductos de frutas o vegetales, incluyendo la extracción con solventes, la extracción asistida con irradiación γ , la extracción con agua caliente, la extracción basada en resinas, extracción asistida por ultrasonidos, extracción con enzimas y extracción con fluidos supercríticos (Calvarano *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Sin embargo estos métodos de extracción pueden causar la degradación de los compuestos debido a las altas temperaturas y a los largos tiempos de extracción, o plantean posibles riesgos para la salud debido al desconocimiento de los criterios de seguridad durante la irradiación. Además, las enzimas utilizadas en la extracción asistida por enzimas son fácilmente desnaturizables (Azmir *et al.*, 2013; Conidi *et al.*, 2014).

Los procesos de filtración a través de membrana con presión, tales como la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa, se han empleado con éxito en la purificación y concentración de compuestos bioactivos de productos naturales. Estos procesos ofrecen ventajas en términos de ausencia de fases de transición, condiciones de operación más suaves, la posibilidad de evitar el uso de aditivos, bajos requerimientos energéticos, eficiencia en la separación y un salto de escala más fácil en comparación con los métodos convencionales (Conidi *et al.*, 2014).

II - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

II - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Cada vez son mayores las evidencias epidemiológicas que relacionan la alimentación y la aparición de enfermedades como la obesidad, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, diabetes e incluso el cáncer. En respuesta a la mayor demanda de los consumidores de productos alimenticios que cumplan con el binomio alimentación-salud, la industria alimentaria está potenciando el diseño de nuevos alimentos funcionales. En esta línea, la capacidad potencial de los péptidos bioactivos de reducir el riesgo de enfermedades crónicas y promover la salud ha despertado el interés del mundo científico y la industria en el posible uso de los mismos como ingredientes funcionales (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

La forma más común de obtención de péptidos bioactivos es mediante hidrólisis enzimática. En diversos trabajos (citados previamente) se ha demostrado que los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática del huevo y caseína tienen una gran bioactividad. El número de proteasas vegetales utilizadas es aún limitado, habiéndose usado fundamentalmente enzimas de origen animal; por lo que es necesario estudiar el uso de otras proteasas de origen vegetal como las cinarasas, proteasas aspárticas presentes en las flores del género *Cynara*, que no sólo tienen una alta actividad proteolítica sino que además producen mayores concentraciones de péptidos hidrofóbicos los cuales han demostrado tener mayor bioactividad. A partir de la flor de alcachofa (*C. scolymus* L.) se podrían obtener extractos enzimáticos para su utilización en la hidrólisis de proteínas alimentarias y la producción de péptidos con potencial bioactividad que sirvieran como ingredientes en futuros alimentos funcionales.

Para la obtención de las cinarasas se dispondría de materia prima abundante ya que la Región de Murcia es la primera comunidad autónoma productora de alcachofa a nivel nacional. Por otra parte, como la última cosecha de alcachofa no se recolecta, dejando que madure la flor, la utilización de estas flores en la obtención de las enzimas hidrolíticas conllevaría el aprovechando de un residuo agrícola. Además, la hidrólisis de proteínas procedentes del huevo y

la leche para la obtención de péptidos bioactivos contribuiría a la revalorización de estas materias primas o de sus subproductos industriales.

Por otro lado, a la hora de considerar la leche como sustrato para la obtención de péptidos bioactivos, un factor a tener en cuenta es el posible efecto que el tratamiento térmico previo de la leche, como la pasteurización, puede tener en el resultado de la hidrólisis enzimática y la bioactividad de los hidrolizados. Además, es fundamental analizar el efecto de la pasteurización y la congelación en la obtención de péptidos bioactivos, ya que se ha observado un mayor ratio de proteólisis tanto en la leche sometida a calentamiento como a congelación (Datta-Roy, 1982).

Por todo ello, esta tesis está dirigida a la caracterización de la actividad hidrolítica de los extractos solubles en agua de flor seca de alcachofa para la producción de péptidos bioactivos, planteándose el **objetivo general** de:

Obtener péptidos bioactivos a partir de caseína bovina, ovoalbúmina y leche mediante la hidrólisis con proteinasas aspárticas presentes en extractos obtenidos de flor de alcachofa (*C. scolymus* L.).

Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

– Caracterizar las condiciones óptimas de hidrólisis con el extracto enzimático de flor de alcachofa de la caseína bovina y ovoalbúmina (concentración de extracto enzimático y sustrato, temperatura y pH) para la producción de hidrolizados peptídicos.

– Obtener hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina con extracto de flor de alcachofa y sus fracciones de peso molecular menor de 3 kDa a diferentes tiempos de hidrólisis y evaluar de su actividad inhibidora de la ECA-I, actividad antioxidante, quelante y antimicrobiana.

– Obtener hidrolizados de leche pasteurizada de vaca y cabra con extracto de flor de alcachofa y cuajo animal comercial, así como sus fracciones de peso molecular menor de 3 kDa.

-
- Evaluar y comparar la actividad inhibidora de la ECA-I, antioxidante, quelante y antimicrobiana de los hidrolizados obtenidos a partir de leche pasteurizada de vaca y cabra con extracto de flor de alcachofa y cuajo animal.
 - Obtener hidrolizados de leche de cabra cruda refrigerada y sometida a congelación mediante extracto de flor de alcachofa.
 - Analizar el efecto que la pasteurización y la congelación de la leche de cabra tienen en la actividad inhibidora de la ECA-I, antioxidante, quelante y antimicrobiana de los péptidos de los hidrolizados obtenidos.
 - Identificar las secuencias de los péptidos bioactivos de los distintos hidrolizados.

III - MATERIAL Y MÉTODOS

III - MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. PROCEDIMIENTO GENERAL

A partir de la fracción soluble en agua de un macerado de flor de alcachofa, se obtuvo un extracto enzimático con proteasas aspárticas (cinarasas). Se estudió la cinética enzimática del extracto en dos sustratos: caseína bovina y ovoalbúmina (Figura III.1).

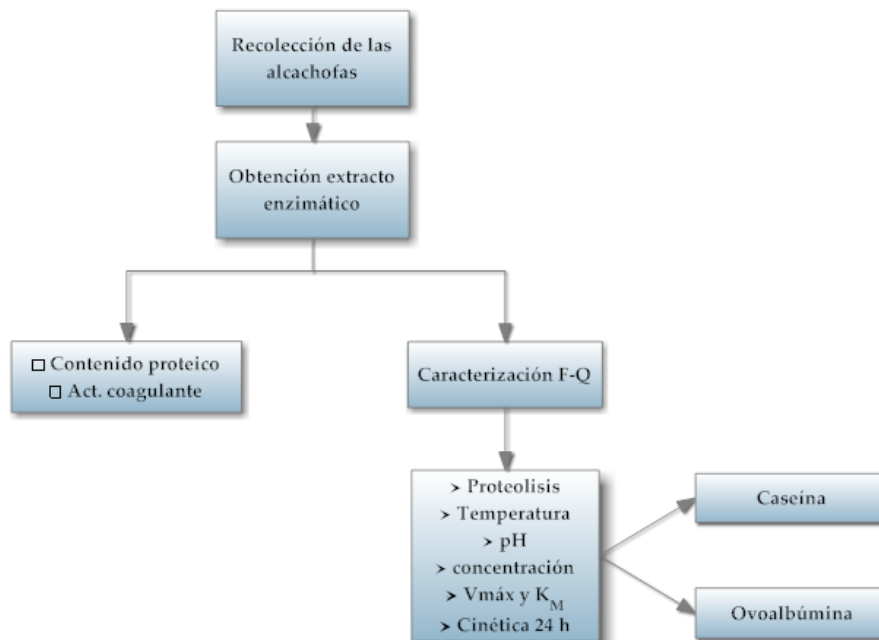


Figura III. 1. Esquema de la obtención y caracterización del extracto de *C. scolymus* L., para los sustratos de caseína bovina y ovoalbúmina.

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se llevaron a cabo diferentes hidrólisis a partir de caseína y ovoalbúmina obteniendo hidrolizados a distintos tiempos de reacción. Se obtuvo además, de cada hidrolizado, la fracción de peso molecular menor de 3 kDa.

Se analizó la cantidad de péptidos totales obtenidos y la proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de cada uno de los hidrolizados y de sus fracciones de peso molecular menor de 3 kDa, así como la actividad antioxidante, IECA y antimicrobiana de los mismos. Además se llevó a cabo la identificación de los péptidos de los distintos hidrolizados mediante LC-MS (Figura III.2).

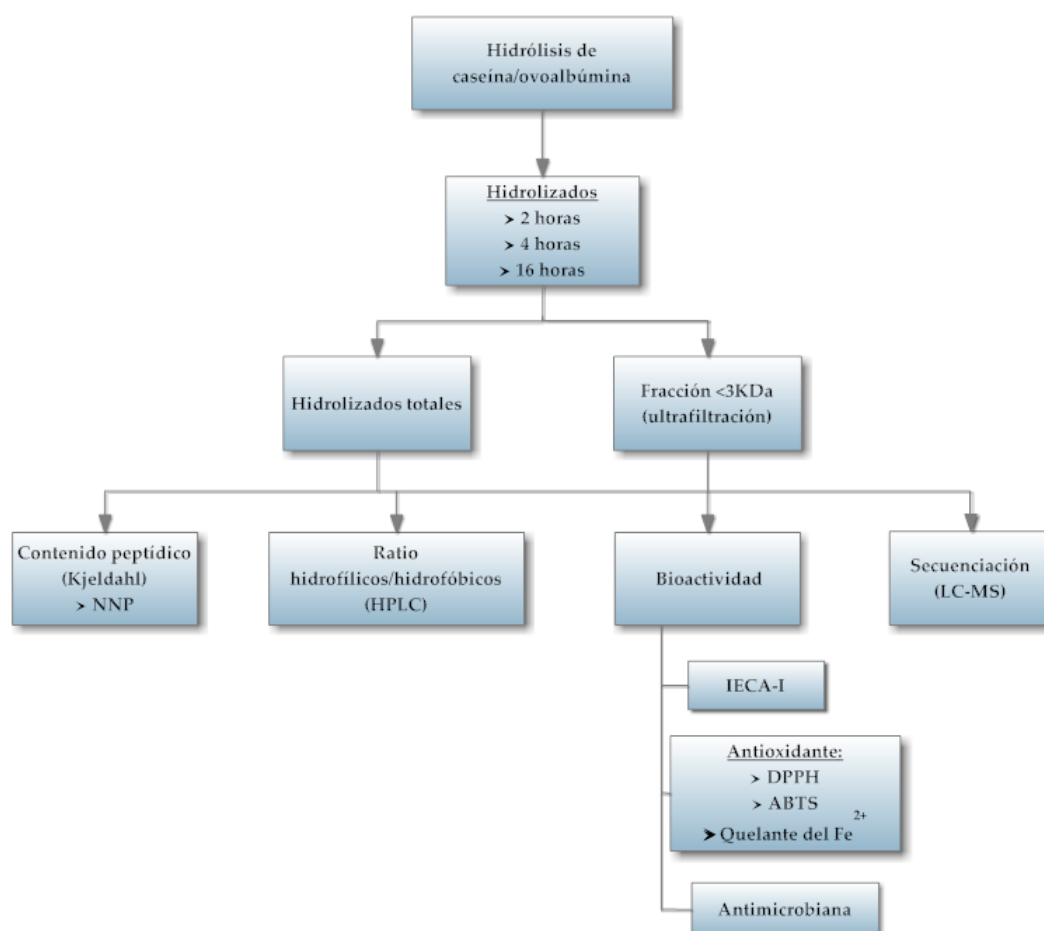


Figura III. 2. Esquema del procedimiento experimental para los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina.

Por otra parte, se realizaron también hidrólisis de diferentes muestras de leche entera con el extracto de flor de alcachofa para obtener hidrolizados peptídicos. Para ello, se hidrolizaron muestras de leche entera de vaca comercial de alta pasteurización y leche entera de cabra obtenida directamente de la granja

y sometida a distintos tratamientos térmicos: cruda refrigerada, pasteurización y congelación, con objeto de estudiar el efecto de dichos tratamientos en la producción de péptidos bioactivos. En el caso de la leche de vaca comercial y la leche de cabra tratada en condiciones de alta pasteurización, se obtuvieron además, hidrolizados utilizando cuajo animal comercial con el fin de comparar su capacidad proteolítica y de producción de péptidos bioactivos con la del extracto enzimático vegetal (Figura III.3).

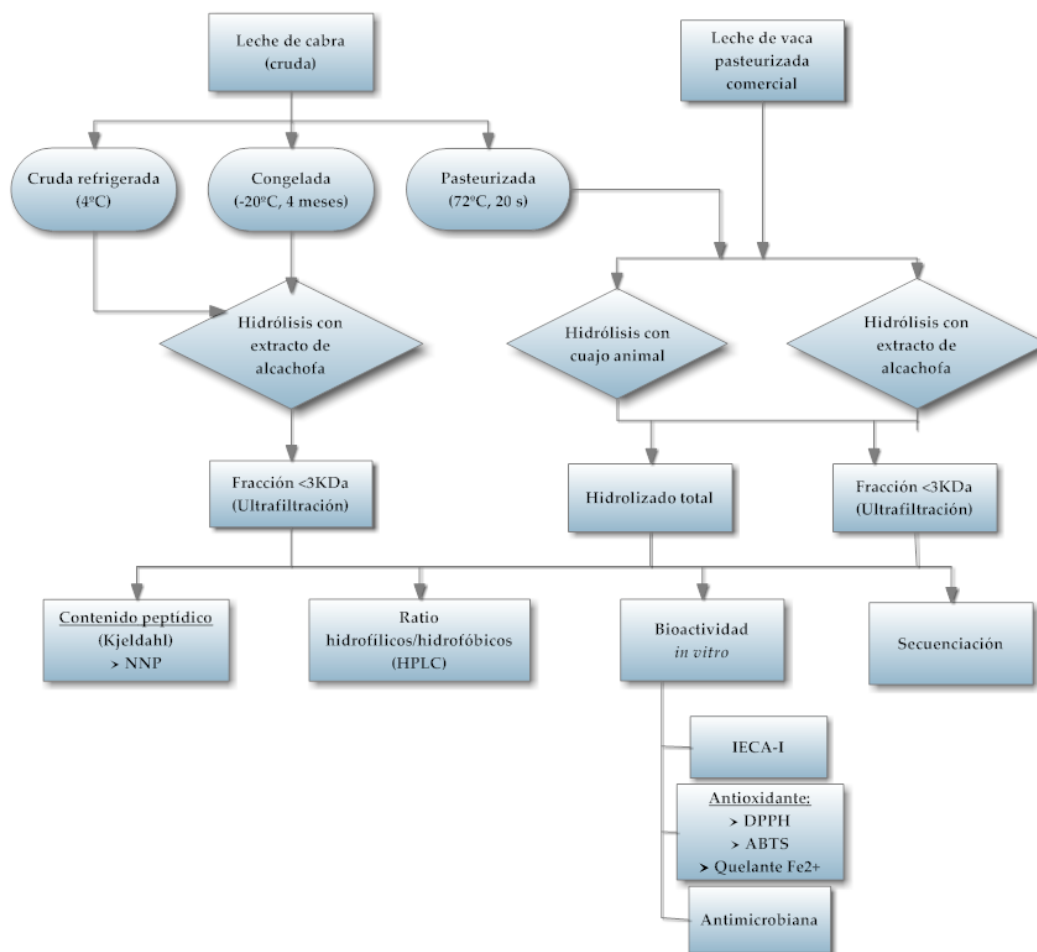


Figura III. 3. Esquema del procedimiento experimental de los hidrolizados de leche.

Se determinó la concentración de péptidos obtenidos y la proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como la actividad antioxidante, quelante del hierro, IECA y antimicrobiana, de las fracciones de peso molecular <3kDa de los hidrolizados de leche preparados. En el caso de la leche, tanto de vaca como de cabra, tratada en condiciones de alta pasteurización, además de las fracciones <3kDa, también se analizaron los hidrolizados totales.

III.2. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

Se detalla a continuación, el material general empleado para el procedimiento experimental. En cada técnica analítica concreta se especifica el equipo y reactivos utilizados.

- Agitador de tubos IKA MS2 Minishaker
- Autoclave PSelecta Autotester E-301Dry
- Balanza analítica Precisa XB 320M
- Balanza electrónica de precisión Precisa XT 220
- Batidora Robot coupe Mini MP 190 V.V. 230 W
- Baño de agua termostático Julabo shake temp SW 22
- Baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons-H
- Bomba de vacío VWR
- Campana de flujo laminar Telstar AV-100
- Centrífuga Eppendorf 5810
- Centrífuga Eppendorf 5415D
- Centrífuga con sistema de refrigeración: Biofuge stratos Heraeus
- Destilador de agua ultrapura Millipore Elix 3UV. Vent Filter MPK01
- Espectrofotómetro: Varian Cary 50 Bio UV-Visible
- Estufa de incubación P-Selecta Incudigit
- Estufa de cultivo Memmert
- Lector de placas: Bio-Tek Synergy HT
- Liofilizador Christ Alpha 1-2LD plus
- pH-metro digital Hanna instruments HI2221
- Placas agitadoras magnéticas y calefactoras IKA Labortechnik RHbasic y Arex Velp Scientifica
- Unidad de digestión BUCHI K-424.
- Unidad de destilación BUCHI B-324.

Además del material detallado se utilizó gran variedad de material fungible de uso común en laboratorio. Las soluciones acuosas fueron preparadas con agua destilada, salvo en el caso de las preparaciones acuosas utilizadas en HPLC en las que se utilizó agua ultra pura. Los productos químicos utilizados fueron en general Sigma-Aldrich y Scharlau de calidad reactivo p.a. o químicamente puros. Para técnicas de HPLC se utilizaron reactivos calidad HPLC.

III.3. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron flores de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) maduras obtenidas de una finca situada en el término municipal de Santomera (Región de Murcia). La recolección se llevó a cabo entre los meses de mayo y junio de los años 2013 y 2014.

III.4. EXTRACTO ENZIMÁTICO VEGETAL

III.4.1. Obtención del extracto.

El extracto enzimático vegetal se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Tejada *et al.* (2003).

A partir de las flores desecadas de la especie *C. scolymus* L., se aislaron estilos y estigmas del resto de la flor cortando con tijera toda la porción de flor sobresaliente de las brácteas.

El material vegetal obtenido fue pesado y macerado a temperatura ambiente en agua destilada durante 24 horas en una proporción peso volumen 1:5. Transcurrido este tiempo, el extracto acuoso fue tamizado para eliminar impurezas y centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado a vacío con papel Whatman nº1.

Los filtrados resultantes fueron congelados a -32°C durante 24 horas para, posteriormente, ser liofilizados a una presión de trabajo entre 4 y 13 Pa. El polvo liofilizado obtenido se envasó herméticamente y se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso.

III.4.2. Determinación del contenido en proteína

El contenido proteico del extracto enzimático vegetal fue determinado mediante el método Bradford (Bradford, 1976).

Este método, basado en la formación de un complejo entre el colorante Brilliant Blue G y las proteínas, supone un aumento en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm que permite relacionar la absorbancia a esta longitud de onda con la concentración de proteína. Esta correlación es lineal en un rango de concentración de 0'2 a 0'9 mg/mL de proteína, y utiliza seroalbúmina bovina como proteína estándar.

El experimento se realizó en tubos de ensayo que contenían 0'1 mL de proteína estándar o de muestra y 5 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluido en agua destilada (1:4) y filtrado, según instrucciones del fabricante. El blanco se preparó con 0'1 mL de agua destilada y 5 mL del reactivo de Bradford. Los tubos se agitaron y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después el contenido se transfirió a las cubetas de espectrofotometría midiendo la absorbancia a 595 nm.

La recta patrón de seroalbúmina fue preparada a partir de una disolución madre de 10 mg/mL en agua destilada. Mediante diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones de ensayo: 0'9, 0'7, 0'5, 0'4, 0'3 y 0'2 mg/mL (Figuras III.4 y III.5). Cada concentración se midió por triplicado. Las muestras problema de extracto vegetal eran preparadas a una concentración de 5mg/mL en agua destilada.

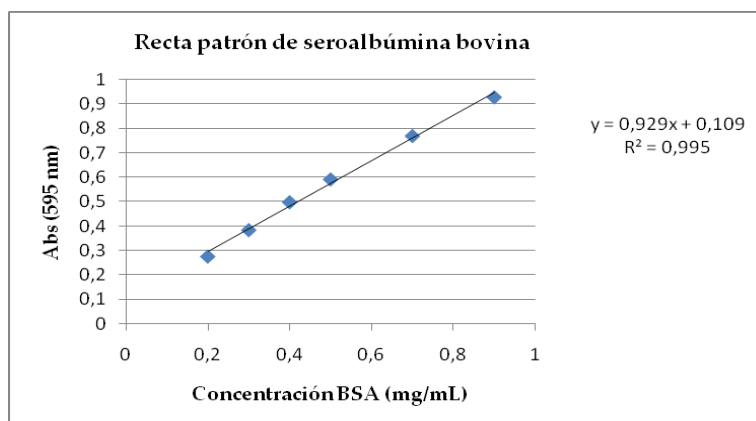


Figura III. 4. Recta patrón del método Bradford con seroalbúmina bovina (0'2-0'9 mg/mL).

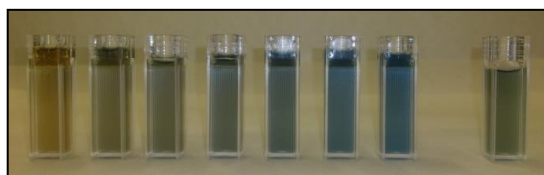


Figura III. 5. Imagen del ensayo de la determinación de proteína: cubetas de espectrofotometría con las diluciones de la seroalbúmina bovina para la recta patrón y el reactivo de Bradford.

III.4.3. Determinación de la actividad coagulante

La actividad coagulante se determinó siguiendo el procedimiento descrito por la *International Dairy Federation* (IDF) (1992). Se preparó el sustrato disolviendo leche desnatada en polvo en una solución de CaCl_2 10 mM (pH 6.5) hasta una concentración final de 0'12 kg/L; a continuación se incubó la leche reconstituida en un baño a 30°C. El ensayo se realizó adicionando 0'1 mL de extracto enzimático por mL de leche reconstituida, a diferentes concentraciones de proteína del extracto entre 0,44 y 3,85 mg/mL. El punto de coagulación se determinó mediante rotación manual del tubo, durante cortos intervalos de tiempo, comprobando la formación de coágulos visibles en las paredes del tubo (Silva y Malcata, 2005).

Se define una unidad coagulante como la cantidad de proteína capaz de coagular 10 mL de leche desnatada reconstituida a 30°C en 100 segundos (Berridge, 1945). La actividad coagulante del extracto vegetal se determinó por triplicado.

III.4.4. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica del extracto enzimático se determinó sobre dos sustratos: caseína bovina y ovoalbúmina, siguiendo la metodología empleada por Silva y Malcata (2005).

III.4.4.1. Determinación de la actividad proteolítica sobre caseína bovina.

El sustrato empleado fue caseína de leche bovina libre de carbohidratos y ácidos grasos (Calbiochem) al 1% (p/v) en tampón citrato 10 mM (pH 6.2) a la que

se añadió azida sódica al 0'03% (p/v) con el fin de evitar el crecimiento microbiano y se incubó en un baño a 30°C.

Tras iniciar la hidrólisis por la adición de 120 µL de disolución de extracto (0'6 mg proteína/mL) a 3 mL de disolución de caseína, se tomaron alícuotas de 0'5 mL, a diferentes tiempos (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos), en tubos eppendorf. La reacción enzimática de estos tubos se inactivó en un baño a 100°C durante 5 minutos, y la actividad proteolítica fue cuantificada por evaluación de los péptidos solubles en una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v). Para ello se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA al 5% (p/v), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en cubeta de cuarzo. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

III.4.4.2. Determinación de la actividad proteolítica sobre ovoalbúmina.

El sustrato empleado fue ovoalbúmina comercial (Acros Organics) en solución al 1% (p/v) en agua destilada, ajustando el pH a 5.5, y se incubó en un baño a 36°C. Una vez atemperado el sustrato, se adicionó 150 µL de disolución de extracto enzimático (4'8 mg proteína/mL), para iniciar la hidrólisis, y se fueron tomando alícuotas de 0'5 mL en tubos eppendorf durante los intervalos de tiempo determinados para este estudio: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos. Se inactivó la reacción enzimática añadiendo 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v), incubándose a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos, para seguidamente medir la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en cubeta de cuarzo. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

III.5.1. Efecto de la temperatura, pH y concentración del extracto

Para determinar las condiciones óptimas de acción de la enzima (temperatura, pH y concentración), se siguió el método descrito por Silva y Malcata (2005), con modificaciones.

III.5.1.1. Caseína

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto en la caseína, se incubaron tubos con 3 mL de una disolución de caseína al 1% (p/v) en tampón citrato 10 mM (pH 6.2) con 120 μ L del extracto a la concentración de 0'6 mg de proteína/mL, a las temperaturas de 22, 30, 40, 50, 60 y 70°C.

Para estudiar el efecto del pH, tubos con 3 mL de distintas disoluciones de caseína al 1% (p/v) en tampón citrato a diferentes valores de pH (5, 5.5, 6, 7 y 8), se incubaron a una temperatura de 30°C junto con 120 μ L del extracto (a una concentración de 0'6 mg proteína/mL).

Para estudiar la linealidad de la enzima, se incubaron a una temperatura de 30°C, tubos con 3 mL con disolución de caseína al 1% (p/v) en tampón citrato 10 mM (pH 6.2) con diferentes concentraciones del extracto, en un rango de 0'13 a 4'8 mg/mL.

Para el estudio de cada uno de los parámetros se tomaron alícuotas de 0,5 mL a diferentes tiempos: 3, 6, 11, 21, 31, 41, 51 y 61 minutos. La actividad proteolítica fue cuantificada por evaluación de los péptidos solubles en una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v). Para ello se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA al 5% (p/v), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en cubeta de cuarzo. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

III.5.1.2. Ovoalbúmina

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto, se incubaron tubos con 3 mL de solución de ovoalbúmina al 1% (p/v) (pH 5.5) y 150 μ L de extracto a concentración de 4'8 mg de proteína/mL, a diferentes temperaturas (22, 30, 36, 40 y 50°C).

Para estudiar el efecto del pH se mantuvo la temperatura de incubación a 36°C y realizaron variaciones en el pH de la disolución de ovoalbúmina al 1% (p/v). Los pHs a probar fueron: 4.5, 5.5, 6.2, 7 y 8.

Para conocer la linealidad del extracto enzimático, se incubaron tubos con 3 mL de la solución de ovoalbúmina al 1% (p/v) (pH 5.5) con 150 μ L del extracto

enzimático a diferentes concentraciones (0'27, 0'34, 0'50, 1'16, 3'04, 3'8, 4'64, 5'76 y 7'5 mg proteína/mL).

En todos los casos, los tiempos en los que fueron tomadas las alícuotas (0,5 mL) fueron: 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos. La actividad proteolítica fue cuantificada por evaluación de los péptidos solubles en una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v). Para ello se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA al 5% (p/v), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en cubeta de cuarzo. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

III.5.2. Estimación de $V_{\text{máx}}$ y K_M .

Para determinar los parámetros cinéticos del extracto liofilizado de alcachofa, se usó el método de Silva y Malcata (2005) con modificaciones. Para el cálculo de los parámetros $V_{\text{máx}}$ y K_M se utilizó el programa Statistica versión 10.0 (StatSoft).

III.5.2.1. Caseína

El ensayo se llevó a cabo utilizando una concentración de extracto vegetal de 0'6 mg de proteína/mL; y como sustrato, disoluciones de caseína en un rango de 1'68-15 mg/mL en tampón citrato 10 mM pH 6.2 a una temperatura de incubación de 30°C. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de reacción: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

III.5.2.2. Ovoalbúmina

Para determinar los parámetros cinéticos sobre este sustrato se utilizó una concentración de extracto vegetal de 4'8 mg/mL en diferentes concentraciones de ovoalbúmina, en un rango de 2-20 mg/mL, a pH 5.5, incubándose a una temperatura de 36°C, y retirando alícuotas a los tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos.

III.5.3. Cinética enzimática durante 24 horas.

La actividad proteolítica del extracto enzimático fue evaluada durante 24 horas en los dos sustratos: caseína y ovoalbúmina, según el método descrito por Silva y Malcata (2005).

III.5.3.1. Caseína

Para la caseína, se emplearon tubos con 3 mL de una disolución al 1% (p/v) en tampón citrato 10 mM a pH 6.2 y a una temperatura de 30°C. A los tubos se le añadieron 120 µL del extracto enzimático a una concentración de 0'6 mg de proteína/mL.

III.5.3.2. Ovoalbúmina

En el caso de la ovoalbúmina se emplearon tubos con 3 mL de una disolución al 1% (p/v) en agua destilada a pH 5.5, y a una temperatura de 36°C. A los tubos se le añadieron 150 µL del extracto a una concentración de 4'8 mg de proteína/mL.

III.6. OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA BOVINA

A partir de las condiciones de hidrólisis óptimas según la caracterización enzimática llevada a cabo para este sustrato, se obtuvieron tres hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis: 2, 4 y 16 horas, cada uno de ellos por triplicado.

Para ello se preparó una disolución de caseína bovina al 1% (p/v) en agua destilada ajustando el pH a 6.2 con NaOH. En el caso de la elaboración de los hidrolizados no se utilizó tampón citrato ni azida sódica para evitar interferencias en los posteriores ensayos de actividad de los péptidos.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en tubos falcon con un volumen de 9 mL de solución de sustrato sumergidos en un baño de agua a 50°C con agitación. Una vez alcanzada esta temperatura en el interior del tubo, se adicionaron 360 µL del extracto enzimático de alcachofa a una concentración de 0'6mg de proteína/mL.

La reacción se paró en los tiempos correspondientes en cada caso, 2, 4 o 16 horas, y se ajustó el pH a 4.6 con HCl. Posteriormente, el hidrolizado se centrifugó

a 4000 g durante 20 minutos, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de filtro de nylon de 0'45 μm mediante kitasato y bomba de vacío.

Por último, al hidrolizado filtrado se le ajustó el pH a 7 con NaOH y se distribuyó en tubos falcon para su almacenamiento a -20°C hasta su utilización.

Para la obtención de la fracción de peso molecular menor de 3 kDa, se utilizaron filtros de centrífuga Amicon Ultra-15 de celulosa regenerada 3.000 NMWL (Merk Millipore). La filtración se llevó a cabo por centrifugación en condiciones de refrigeración a 4°C en centrífuga de rotor de cabezal basculante con un volumen de 15 mL/falcon a 4000 g durante 40 min. El permeado resultante se almacenó en tubos falcon para su congelación a -20°C hasta su uso.

III.7. OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE OVOALBÚMINA

A partir de las condiciones de hidrólisis óptimas según la caracterización enzimática llevada a cabo para este sustrato, se obtuvieron tres hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis: 2, 4 y 16 horas, cada uno de ellos por triplicado.

Para ello se preparó una disolución de ovoalbúmina al 1% (p/v) en agua destilada ajustando el pH a 6.2 con NaOH. En el caso de la elaboración de los hidrolizados no se utilizó tampón citrato ni azida sódica para evitar interferencias en los posteriores ensayos de actividad de los péptidos.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en tubos falcon con un volumen de 20 mL de solución de sustrato sumergidos en un baño de agua a 36°C con agitación. Una vez alcanzada esta temperatura, se adicionó 1 mL del extracto enzimático de alcachofa a una concentración de 4'64 mg de proteína/mL a cada falcon.

La reacción se paró en el tiempo correspondiente en cada caso, 2, 4 o 16 horas, ajustando el pH a 4.5 con HCl, punto isoelectrico de la ovoalbúmina, que causó su precipitación. Posteriormente, el hidrolizado se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos recogiendo el sobrenadante y filtrandolo a través de filtro de nylon de 0'45 μm mediante matraz kitasato y bomba de vacío.

Por último al hidrolizado filtrado se le subió el pH a 7 con NaOH y se distribuyó en tubos falcon para su almacenamiento a -20°C hasta su utilización.

Para la obtención de la fracción de peso molecular menor de 3 kDa, se realizó ultrafiltración en centrífuga como en el caso anterior en condiciones de refrigeración a 4°C, en centrífuga de rotor de cabezal basculante con un volumen de 15 mL/falcon a 4000 g durante 40 min. El permeado resultante se almacenó en tubos falcon para su congelación a -20°C hasta su uso.

III.8. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE LECHE ENTERA DE CABRA Y VACA

Se obtuvieron varios hidrolizados a partir de muestras de leche entera de cabra y de vaca.

En el caso de la leche de cabra, y con objeto de estudiar la influencia de diferentes tratamientos térmicos sobre los hidrolizados peptídicos, además de hidrolizar leche cruda refrigerada, se realizaron otras dos hidrólisis a partir de leche tratada a temperatura de alta pasteurización y de leche almacenada en congelación a -20°C.

Además, con la leche tratada a temperatura de alta pasteurización, se realizó también una hidrólisis con cuajo animal para comparar el hidrolizado con el obtenido a partir del extracto vegetal de alcachofa.

Para la leche de vaca, se hidrolizaron muestras de leche de vaca comercial de alta pasteurización utilizando el extracto vegetal de alcachofa y el cuajo animal.

Todos los hidrolizados se realizaron por triplicado.

III.8.1. Obtención de la leche

III.8.1.1. *Recogida de la leche de cabra*

La leche de cabra se obtuvo de la Granja Veterinaria de la Universidad de Murcia, en Guadalupe, procedente de cabras murciano-granadinas criadas en intensivo.

Las cabras eran ordeñadas una vez al día, y la leche se almacenaba en un tanque refrigerado a 6°C. Se recogieron 4L de leche cruda refrigerada por día, a primera hora de la mañana. La leche se almacenó en botellas de plástico de 1L de capacidad provistas de tapones de seguridad, y se transportaron en un envase de

poliespan con pilas de hielo hasta el laboratorio donde se procesaron a su llegada. La recogida se llevó a cabo durante tres semanas consecutivas de mayo de 2016.

III.8.1.2. Obtención de la leche de vaca comercial

La leche de vaca entera comercial, de alta pasteurización (72°C durante 20 segundos) y refrigerada, en formato tetra brik, fue adquirida en un supermercado nacional en tres días distintos y procediendo de diferentes lotes, durante el mes de marzo de 2016. Se conservó en refrigeración a 4°C.

III.8.2. Tratamientos térmicos de la leche de cabra

III.8.2.1. Leche cruda refrigerada

La leche cruda de cabra se recogió directamente del tanque a una temperatura de 6°C y se conservó en condiciones de refrigeración a 4°C hasta su procesado el mismo día de su recogida.

III.8.2.2. Leche tratada en condiciones de alta pasteurización

Se llevó a cabo la pasteurización de la leche de cabra a la temperatura de 72°C durante 20 segundos. Posteriormente la leche se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su utilización el día siguiente.

III.8.2.3. Leche congelada

La leche cruda de cabra refrigerada se sometió a un proceso de congelación lenta almacenándose a una temperatura de -20°C en recipientes de plástico de 2 L de capacidad con tapón de seguridad, durante 4 meses.

III.8.3. Determinación de la proteína de la leche

El contenido en proteína de la leche de vaca y de cabra se determinó mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1990) la misma mañana en que la leche fue adquirida en el supermercado o recogida en la granja, respectivamente. En ambos casos, a la hora de llevar a cabo las hidrólisis, las concentraciones de extracto enzimático vegetal y del cuajo animal se ajustaron en función de la concentración de proteína de la leche.

Reactivos:

- Ácido sulfúrico 98% (Scharlau)
- Tableta de catalizador Kjeldahl, 5g/tableta (Merck)
- NaOH 40%
- Ácido bórico (Scharlau)
- Rojo de metilo 1% (Panreac)
- HCl 0'1N

Procedimiento:

2 mL de muestra de leche se llevaron a un tubo de Kjeldahl para su digestión con 10 mL de ácido sulfúrico en presencia del catalizador. Los tubos se llevaron al equipo de digestión (Büchi Digestion Unit K-424), haciendo hervir la muestra durante aproximadamente una hora hasta el fin de la digestión. El producto de la digestión se destiló (Büchi Distillation Unit B-324) en presencia de una solución saturada de NaOH, recogiéndose el destilado en 25 mL de una solución de ácido bórico al 4%, para posteriormente realizar la valoración del amonio presente mediante la titulación del ión borato (proporcional a la cantidad de N) con HCl 0'1N. Se usó como indicador rojo de metilo.

El contenido en N se calculó aplicando la siguiente fórmula: $N = V \times N \times 14$.
Donde

V: volumen en mL de ácido gastado en la titulación

N: Normalidad del ácido

14: peso atómico del nitrógeno

Para la transformación del contenido en N en contenido proteico se multiplicó por el factor de conversión 6'38, específico de los productos lácteos.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.8.4. Determinación de la concentración del cuajo animal.

La determinación de la concentración de cuajo animal utilizada para la comparación de su actividad proteolítica en la producción de péptidos bioactivos respecto al extracto de flor de alcachofa, se realizó en base a los tiempos de coagulación en la leche de ambos, tal y como se describe en Corrons *et al.* (2012).

La concentración adecuada de cuajo animal se calculó según el método de la determinación de la actividad coagulante (IDF, 1942), detallado en el apartado III.4.3., a partir de la concentración necesaria para la aparición de coágulos en 104 segundos a 30°C. A este tiempo, se produce la coagulación de la leche con el extracto enzimático vegetal a la concentración óptima estudiada para la hidrólisis de la caseína al 1%.

Una vez hallada la concentración de cuajo animal a utilizar se ajustó según la concentración de proteína de la leche a hidrolizar.

III.8.5. Obtención de los hidrolizados de leche entera de vaca y cabra

Los hidrolizados peptídicos de leche entera se obtuvieron según el método descrito por Timón *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

La hidrólisis se llevó a cabo a las condiciones determinadas para la hidrólisis de la caseína, proteína mayoritaria de la leche; en baño de agitación, con un pH de la leche de 6.5-6.8, durante 16 horas a una temperatura de 50°C. A pesar de que el pH considerado como óptimo en la hidrólisis de la caseína fue de 6.2, las hidrólisis de la leche entera se realizaron al pH propio de la leche ya que éste es próximo al pH estimado como idóneo y además, esto permite estudiar la hidrólisis suprimiendo el paso de ajuste de pH con objeto de facilitar así el traslado del proceso a escala industrial.

Se distribuyó el sustrato en tubos falcon sumergidos en un baño de agua a temperatura controlada. Cuando el interior del falcon alcanzó los 50°C, se añadieron 40 µL de solución de extracto vegetal o de cuajo animal por mL de leche, preparados a la concentración necesaria según la concentración de proteína de la leche, se homogeneizó el contenido y se mantuvo en agitación continua.

Transcurridas 16 horas de hidrólisis, se paró la reacción llevando los falcons a un baño de agua a temperatura de 100°C durante 15 minutos.

El contenido de los tubos (cuajada y suero) se homogenizó con una batidora y se llevó de nuevo a un baño a 40°C durante una hora.

Al homogeneizado resultante se le ajustó el pH con HCl hasta 4.6, y se centrifugó en tubos de 30 mL a 3200 g durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró con doble papel Whatman nº1 mediante kitasato y bomba de vacío. Se ajustó

el pH del filtrado a 7 con NaOH 1N y se volvió a centrifugar a 3200 g durante 30 minutos.

El sobrenadante se hizo pasar a través de filtros de nitrato de celulosa de 0'2 μm y 0'1 μm .

Por último, para obtener la fracción de peso molecular menor de 3 kDa, el hidrolizado se sometió a una ultrafiltración con filtros de centrifuga a un volumen de 15 mL a 4000 g durante 40 minutos con centrifuga de rotor con cabezal basculante.

Todos los hidrolizados se realizaron por triplicado.

III.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PEPTÍDICA DE LOS HIDROLIZADOS

III.9.1. Nitrógeno no proteico (NNP):

El NNP se determinó por duplicado en cada uno de los hidrolizados después de precipitar las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 5% en una proporción 1:2, y de centrifugar el sobrenadante a 3200 g durante 20 minutos. Para la determinación del NNP del sobrenadante obtenido se utilizó el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1990) descrito en el apartado III.8.3.

En el caso de los hidrolizados de ovoalbúmina, el factor de conversión utilizado para el cálculo de concentración de péptidos fue 6'7, y para la caseína y la leche, 6'38.

III.10. DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS HIDRÓFOBOS E HIDRÓFILOS

Los péptidos solubles en agua de los hidrolizados se separaron en un HPLC (Shimadzu LC-10AD) en fase reversa siguiendo el método de González de Llano (1995) con algunas modificaciones.

Procedimiento

La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna C18 Eclipse XDB 5 μm (4'6X250 mm) (Agilent), acondicionada a 40°C en un horno modelo CTO-10AC (Shimadzu).

Se inyectaron 20 μ L de cada hidrolizado, mediante autoinyector modelo SIL-10 AD (Shimadzu).

Se utilizaron dos fases móviles para la separación: fase A, 0'1% de ácido trifluoroacético en agua destilada (p/v), y fase B, 0'1% de ácido trifluoroacético (p/v) en acetonitrilo:agua, 60:40 (v:v).

Las separaciones se llevaron a cabo a un flujo de 1mL/minuto. Y el método se configuró de la siguiente manera: eluyente A durante 20 minutos seguido de un gradiente lineal de 0% a 80% de fase B hasta los 90 minutos.

Por último, para acondicionar la columna para la siguiente separación, se llevó a cabo un gradiente lineal en 10 minutos hasta 100% de fase A.

La detección se realizó con un detector Diode array modelo SPD-M10A (Shimadzu), a una longitud de onda de 214 nm, a la cual los péptidos presentan mayor absorbancia.

Una vez efectuada la separación cromatográfica, se determinó la naturaleza hidrofílica de los péptidos en base al tiempo de retención de los mismos. Así, se estima que los péptidos hidrofílicos aparecen en la porción de péptidos eluida entre el aminoácido Tyr y el Trp, y el grupo de péptidos hidrofóbicos después del Trp hasta los 90 minutos. Para la identificación de los aminoácidos de referencia, se utilizaron patrones comerciales (L-Tyr, +99% (Acros Organics) y L-Trp \geq 98% (Sigma-Aldrich).

Después del análisis, se integró el área de los péptidos excluyendo los aminoácidos. La relación de péptidos hidrófobos/hidrófilos se obtuvo dividiendo el área total de los picos de la fracción de péptidos hidrófobos entre el área total de los picos integrados en la fracción de péptidos hidrófilos.

III.11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS HIDROLIZADOS

Se analizó la actividad antimicrobiana de cada uno de los hidrolizados obtenidos, así como de su fracción peptídica <3kDa frente a las siguientes bacterias: *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*.

Estándares y productos químicos:

Las bacterias testigo se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), utilizándose para los ensayos de actividad antimicrobiana las siguientes especies y (cepas): *Listeria innocua* (910-T); *Enterococcus faecalis* (481); *Escherichia coli* (101); *Pseudomonas fluorescens* (378).

Los medios de cultivo utilizados fueron: agua de peptona de Panreac-Cultimed (Barcelona, España); caldo de triptona soja (TSB) de Scharlau (Sentmenat, España) y agar de recuento en placa (PCA) de Scharlau (Sentmenat, España).

Para los controles positivos de inhibición se utilizó gentamicina, de pureza $\geq 95\%$, de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Procedimiento:

El efecto de la aplicación de los hidrolizados se determinó sobre la curva de crecimiento de cada cepa en estudio y para cada hidrolizado en las distintas concentraciones y condiciones ensayadas (hidrolizado total y fracción menor de 3 kDa), según el método de Hill *et al.* (2013) en microplaca de 96 pocillos, con ligeras modificaciones.

Los microorganismos se sembraron en medio PCA con la técnica de agotamiento en triple estría. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 35°C, excepto en el caso del *Pseudomonas*, en el que la temperatura de incubación fue de 25°C. Tras estas 24 horas, se llevó una colonia a 100 mL de agua de peptona y se incubó durante otras 24 horas a la temperatura óptima del microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones decimales en agua de peptona al 1% realizando la última dilución en caldo TSB para conformar el inóculo que se cargará en la placa, asegurando una población microbiana inicial similar en todos los pocillos. La concentración de inóculo requerida para llevar a cabo las curvas de crecimiento (aproximadamente $2 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colonias (u.f.c.) $\cdot \text{mL}^{-1}$), se estudió para cada microorganismo haciendo pruebas preliminares a distintas diluciones del cultivo.

La determinación de la concentración del inóculo, en cada caso, se llevó a cabo mediante siembra en superficie en medio PCA y contaje de unidades formadoras de colonia en placa, transcurridas 24 horas a la temperatura de incubación óptima para cada microorganismo.

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo realizando cultivo en placas estériles de 96 pocillos Optical Btm Plt polymerase base (Nunc International) de 300 μ L/pocillo, con una proporción de inóculo: hidrolizado de 1:1. Se incluyó un control negativo con agua destilada estéril en lugar de hidrolizado y un control positivo con una disolución de gentamicina a 10 mg/mL en agua destilada. Cada una de las muestras y controles se hicieron por triplicado.

Mediante un lector de placas Bio-Tek modelo Synergy HT, se cuantificó la absorbancia a 650 nm de longitud de onda a lo largo de 15 horas de incubación a la temperatura óptima del microorganismo, tomando medidas a intervalos de 10 minutos. En el caso de *Pseudomonas*, debido a la duración de su fase de latencia, se hizo una incubación de cuatro horas en estufa, previa a lectura en el equipo.

Los datos obtenidos fueron procesados con la aplicación informática DMFit (DM: Dynamic Modelling) para el ajuste de las curvas de crecimiento según el modelo desarrollado por Baranyi y Roberts (1994), obteniendo los parámetros cinéticos más representativos (duración de la fase de latencia y velocidad máxima de crecimiento), así como su crecimiento máximo.

III.12. ACTIVIDAD IECA-I DE LOS HIDROLIZADOS

La determinación de la actividad IECA-I de los hidrolizados se llevó a cabo según el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (1971) modificado por Miguel *et al.* (2004).

De manera análoga a la forma de acción de la ECA sobre la angiotensina I (liberando la angiotensina II y el dipéptido His-Leu), la enzima actúa sobre el sustrato de reacción empleado en el método, hipuril-histidil-leucina (HHL), liberando el ácido hipúrico y el dipéptido His-Leu. El método se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm de la absorbancia del ácido hipúrico liberado en la reacción.

Reactivos:

- Tampón fosfato potásico 0'1 M y NaCl 0'3M (pH 8.3)
- N-Hippuryl-His-Leu hidratado, $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma)
- Enzima angiotensina-I de pulmón de conejo (ECA-I) (Sigma)
- Acetato de etilo

Procedimiento:

A 100 μL de solución sustrato (constituido por HHL 5 mM, disuelto en tampón fosfato potásico 0'1M y cloruro sódico 0'3M de pH 8.3) se añadieron 40 μL de la muestra. Las muestras se analizaron inicialmente a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se adicionaron 20 μL de ECA (2 mU) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos en un baño de agua con agitación. Posteriormente, la enzima se inactivó por descenso del pH, adicionando 150 μL de HCl 1N. El ácido hipúrico formado en la reacción se extrajo añadiendo 1000 μL de acetato de etilo. Se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se tomaron 800 μL de la fase orgánica. La eliminación del acetato de etilo se llevó a cabo por calentamiento a 95°C durante unos 15 minutos en placa calefactora para eppendorfs hasta que sólo quedó el residuo del ácido hipúrico. Este residuo se resuspendió en 1 mL de agua destilada y tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en cubeta de cuarzo.

Se llevó a cabo un blanco de reacción, añadiendo el HCl previamente a la adición de la ECA-I.

La actividad de cada muestra se determinó por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la ECA-I (%IECA-I) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IECA-I}\% = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / (\text{Abs control} - \text{Abs blanco}) \times 100,$$

donde, Abs control: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la reacción de la ECA (sin inhibidor), Abs blanco: Absorbancia del HHL (que no ha reaccionado porque se añade HCl previamente a adicionar la ECA-I), y Abs muestra: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA-I en presencia de sustancias inhibidoras.

Se utilizó captopril (Sigma) (1mM) como sustancia de referencia, para poner a punto la técnica.

Para calcular la IC_{50} , (la concentración de péptidos necesaria para el 50% de la actividad IECA), se prepararon diluciones a diferentes concentraciones del hidrolizado y se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración ensayada. Posteriormente se representó en una hoja de cálculo (programa Excel versión 2010 de Microsoft Office) el porcentaje de la actividad IECA frente a la concentración del hidrolizado utilizada (μg péptidos/mL), se obtuvo la ecuación

de la recta ($y = ax + b$), y con ésta se calculó la concentración del hidrolizado que da una actividad de inhibición del 50%, es decir $IC_{50} = (50 - b)/a$. (Figura III.6).

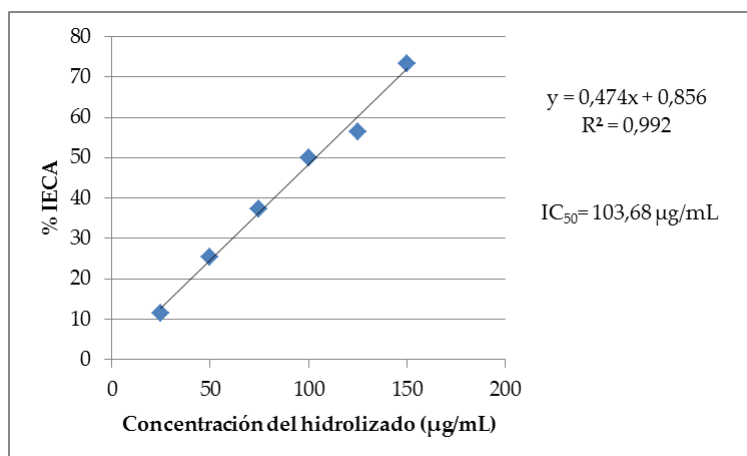


Figura III. 6. Ejemplo del cálculo de la IC_{50} de la ECA-I en una muestra de hidrolizado total de leche de cabra pasteurizada obtenido con extracto de flor de *C. scolyms* L.

III.13. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS HIDROLIZADOS

La determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados se llevó a cabo evaluando la capacidad para captar los radicales libres DPPH y ABTS. Además, se analizó la capacidad quelante del hierro (II).

III.13.1. Actividad antioxidante frente el radical DPPH

Se llevó a cabo el método descrito por Bersuder *et al.* (1998) con ligeras modificaciones. El radical DPPH tiene una banda de absorción a 517 nm; y la absorbancia disminuye al desaparecer este radical cuando se reduce en presencia de un compuesto antioxidante.

Reactivos:

- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Aldrich)
- Etanol puro (Scharlau)

Procedimiento:

500 μL de cada hidrolizado de péptidos se mezclan con 500 μL de etanol y 125 μL de solución DPPH 0'02% (p/v) en etanol. La solución de DPPH se preparó en el momento del ensayo. Se incubó 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos. La reducción de los radicales de DPPH se midió a 517 nm en el espectrofotómetro.

Se realizó un control usando agua destilada en lugar de la muestra. El porcentaje actividad antioxidante se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DPPH RSA\%} = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs control} \times 100,$$

donde, Abs control es la absorbancia del DPPH con agua en lugar de hidrolizado y la Abs muestra es la absorbancia del radical DPPH en presencia del hidrolizado.

Además, se calculó la actividad antioxidante equivalente al Trolox (Sigma) (TEAC), (μM Trolox/mg de péptidos) de los hidrolizados. Para ello se llevó a cabo la representación gráfica del porcentaje de actividad antioxidante frente al radical DPPH en función de la concentración de Trolox (2-22 μM) y se utilizó la ecuación de la recta obtenida, $y = 3,479x + 0,029$, con un $R^2 = 0,997$, para la interpolación (Figura III.7).

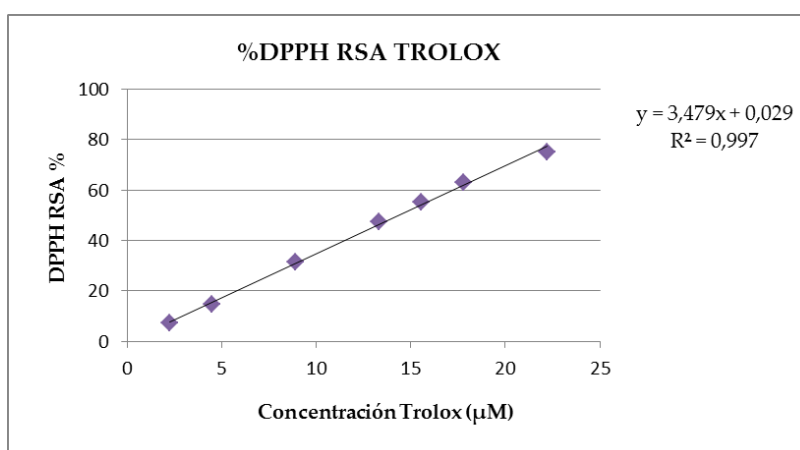


Figura III. 7. Recta de la actividad captadora de radicales DPPH del Trolox (%) a distintas concentraciones (2-22 μM).

III.13.2. Actividad antioxidante frente al radical ABTS

Para el análisis de la capacidad captadora del radical de ABTS (ABTS^{•+}) de los péptidos, se llevó a cabo el método descrito por De Gobba *et al.* (2014a) con ligeras modificaciones, basado en la decoloración del radical de ABTS^{•+} en presencia de sustancias reductoras.

Reactivos:

- Sal de diamonio 2,2-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ≥98% (HPLC) (ABTS). (Sigma).
- Persulfato potásico
- Tampón fosfato 10 mM (pH 7.4)

Procedimiento:

Para crear el radical ABTS^{•+}, se dejó reaccionar 14 horas una solución de ABTS (19'4 mM) y persulfato potásico (6'7 mM) en agua destilada. La solución de ABTS^{•+}, se diluyó aproximadamente unas 350 veces con tampón fosfato 10 mM (pH 7.4) para conseguir una absorbancia de 0.6-0.7 a 405 nm.

A 200 µL de la solución de trabajo de ABTS^{•+} se le añadieron 50 µL de hidrolizado (a diferentes concentraciones) y se midió la absorbancia a 405 nm durante 30 minutos en el lector de placas (Bio-Tek Synergy HT).

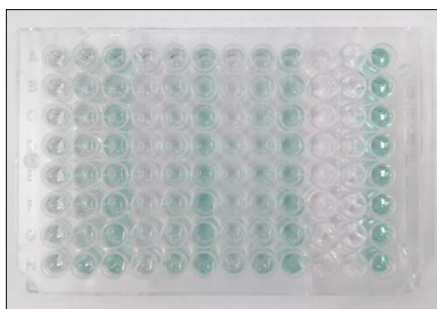


Figura III. 8. Imagen del ensayo de la actividad antioxidante frente al radical de ABTS: microplaca cargada con muestras de hidrolizados a diferentes diluciones y radical ABTS^{•+}.

La absorbancia de la medición final se utiliza para calcular el porcentaje de actividad de captación del radical ABTS, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{RSA}\% = 100 - [100 \times (\text{Abs muestra}) / (\text{Abs control})]$$

donde, Abs control, es la absorbancia de la muestra control con agua en lugar de hidrolizado; Abs muestra es la absorbancia de la muestra de hidrolizado.

Los hidrolizados se diluyeron en agua destilada a varias concentraciones utilizando en el ensayo las concentraciones que dan una actividad entre el 10 y 90%. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

Para calcular la IC_{50} , (la concentración de péptidos necesaria para la captación del 50% del radical de ABTS), se prepararon diluciones a diferentes concentraciones del hidrolizado y se calculó el porcentaje de captación para cada concentración ensayada. Posteriormente, se representó en una hoja de cálculo (programa Excel versión 2010 de Microsoft Office) el porcentaje de captación del radical de ABTS frente a la concentración del hidrolizado utilizada (μg péptidos/mL), se obtuvo la ecuación de la recta ($y = ax + b$) y con ésta se calculó la concentración del hidrolizado que da una actividad de captación del radical del 50%, es decir $IC_{50} = (50 - b)/a$ (Figura III.9).

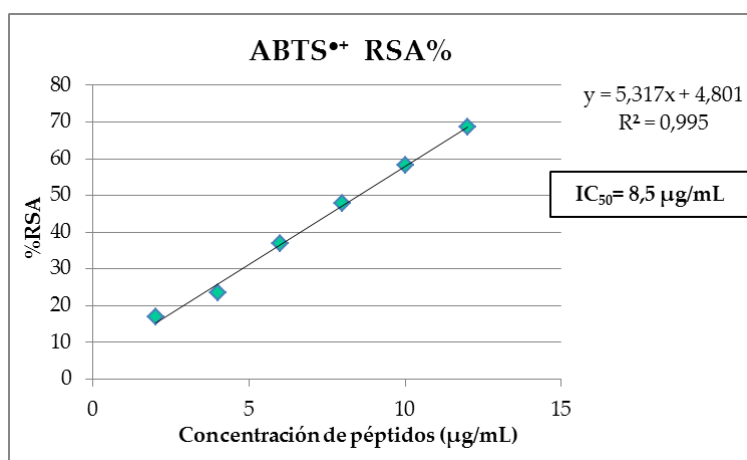


Figura III. 9. Ejemplo del cálculo de la IC_{50} de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ en una muestra de hidrolizado total de leche de vaca pasteurizada obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* L.

Además se calculó la actividad antioxidante equivalente al Trolox (Sigma) (TEAC). Para ello se llevó a cabo la representación gráfica del porcentaje de actividad antioxidante frente al radical $ABTS^{\bullet+}$ en función de la concentración de

Trolox (2-10 μM) y se utilizó la ecuación de la recta obtenida, $y = 6,728x + 1,891$, con un $R^2 = 0,997$, para la interpolación (Figura III.10).

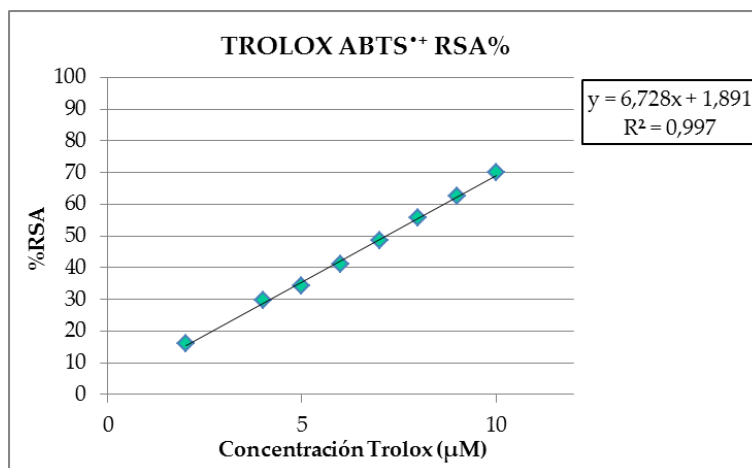


Figura III. 10. Recta de actividad captadora de radicales ABTS^{••} del Trolox (%) a diferentes concentraciones (2-10 μM).

III.13.3. Actividad quelante del hierro (II)

Este ensayo se basa en el cambio de color de la ferrozina, que es un compuesto incoloro, a púrpura cuando se compleja con iones de hierro (Fe^{2+}). El método empleado es el descrito por Wu *et al.* (2007) con ligeras modificaciones.

Reactivos:

- Ferrozina (Aldrich).
- Cl_2Fe

Procedimiento:

En una microplaca transparente se mezclaron 25 μL del hidrolizado con 100 μL de una solución de Cl_2Fe 75 μM en agua destilada y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 μL de solución de ferrozina (500 μM en agua) y se midió la absorbancia a 560 nm en el lector de placas (Bio-Tek Synergy HT). La inhibición de la formación del complejo hierro-ferrozina se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad quelante del hierro (\%)} = 100 - [100 \times (\text{Abs muestra} / \text{Abs control})]$$

donde, Abs control es la absorbancia de la ferrozina complejada con agua en lugar de hidrolizado y la Abs muestra es la absorbancia de la ferrozina complejada en presencia del hidrolizado.

De forma preliminar se probaron diferentes diluciones de los hidrolizados, utilizando las concentraciones que dieron una actividad de inhibición entre el 5 y el 90%.

Para calcular la IC_{50} , (la concentración de péptidos necesaria para el 50% de actividad quelante), se prepararon diluciones a diferentes concentraciones del hidrolizado y se calculó el porcentaje de actividad quelante para cada concentración ensayada. Posteriormente se representó en una hoja de cálculo (programa Excel versión 2010 de Microsoft Office) el porcentaje de actividad quelante del hierro (II) frente a la concentración del hidrolizado utilizada (μg péptidos/mL), se obtuvo la ecuación de la recta ($y = ax + b$) y con ésta se calculó la concentración del hidrolizado que da una actividad de captación del radical del 50%, es decir $IC_{50} = (50 - b)/a$ (Figura III.11).

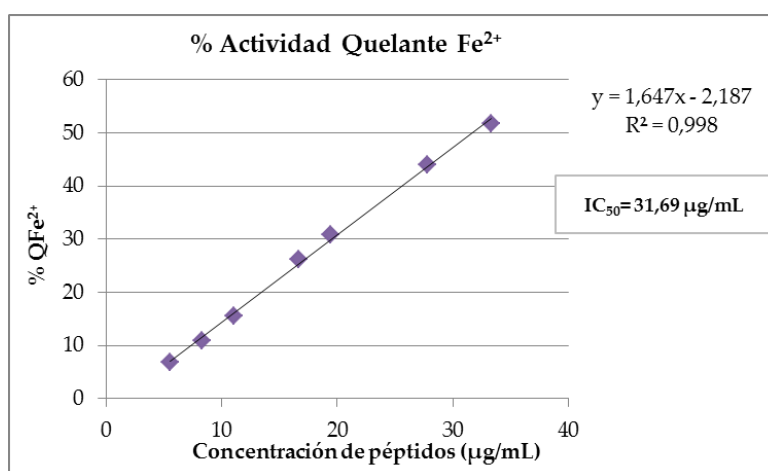


Figura III. 11. Ejemplo del cálculo de la IC_{50} de la actividad quelante del Fe^{2+} en una muestra de la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado leche de cabra cruda refrigerada obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* L.

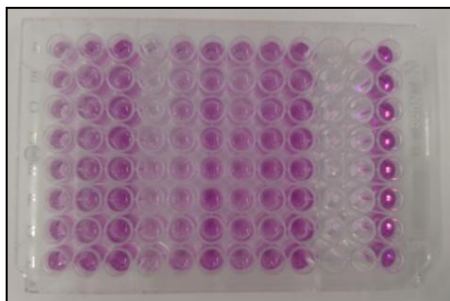


Figura III. 12. Imagen del ensayo de la actividad quelante del hierro (II): microplaca cargada con muestras de hidrolizados a distintas diluciones.

III.14. IDENTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.

La identificación de los péptidos presentes en los distintos hidrolizados se llevó a cabo en el servicio de proteómica de la Universidad de Córdoba. La metodología utilizada fue la siguiente:

Digestión de proteínas:

La digestión proteolítica se realizó mediante la adición de tripsina (Promega, Madison, WI), 12,5 ng / μ L de enzima en bicarbonato de amonio 25 mM, y se incubó a 37°C durante la noche. La digestión de proteínas se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético a una concentración final del 1%. Las muestras una vez digeridas se secaron en speedvac.

Análisis de nLC - MS2

La nanocromatografía líquida (nLC) se realizó en un equipo Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) con una columna C18 (75 μ m x 50 cm) Acclaim Pepmam (Thermo Scientific). Previamente, la mezcla de péptidos se cargó en una precolumna Pepmap Acclaim (Thermo Scientific) de 300 μ m x 5 mm en una mezcla acetonitrilo al 2% / TFA al 0,05% durante 5 min a un flujo de 5 μ L / min. La separación de los péptidos se realizó a 40°C en todas las muestras. El tampón de fase móvil A estaba compuesto de agua y ácido fórmico al 0,1%. La fase móvil B estaba compuesta de acetonitrilo al 20% y 0,1% de ácido fórmico. Las muestras se separaron a 300 nL/min. La fase móvil B aumentó del 4 al 45% en 60 minutos; del 45 al 90% durante 1 minuto, seguido de un lavado de 5 min a 90% de

fase B y un reequilibrado final de 15 min a 4% de fase B. El tiempo total de cromatografía fue de 85 minutos.

En la elución de los péptidos los cationes se transformaron en iones gaseosos mediante ionización por nanoelectrospray y se analizaron en un equipo Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific). El espectrómetro de masas se operó en modo positivo.

La exploración de barrido de los precursores de péptidos entre 400 y 1500 m/z se llevó a cabo a una resolución de 120 K (a 200 m/z) con un detector de iones 5×10^5 . La MS en tándem se realizó por aislamiento con cuadrupolo a 1 Th seguido de fragmentación CID con una energía de colisión normalizada de 35 y posteriormente el análisis de barrido rápido de MS en trampa de iones. El detector iónico AGC se ajustó a 10^2 , siendo el tiempo máximo de inyección de 75 ms. Sólo los precursores con estado de carga 2-6 se muestrearon para MS2. El tiempo de exclusión dinámica se fijó en 15 segundos con una tolerancia de 10 ppm entre los precursores seleccionados y sus isótopos. Asimismo, se activó la selección de precursores monoisotópicos. Los análisis se llevaron a cabo en modo velocidad máxima con tres ciclos. Es decir, el equipo llevó a cabo eventos MS2 de forma continua hasta que la lista de precursores no excluidos disminuyó a 0 o durante 3 segundos.

Análisis de los datos

Los datos brutos se procesaron utilizando el programa Proteome Discoverer (versión 2.1.0.81, Thermo Scientific). Los espectros MS2 se buscaron en la base de datos Uniprot_yourorganism_Aug2016 (www.uniprot.org) utilizando un motor SEQUEST HT. Se establecieron como variables de modificación para la búsqueda en la base de datos la digestión no enzimática de la metionina y la oxidación de la metionina. Se estableció una tolerancia para la masa de los precursores de 10 ppm y de 0,6 Da para sus iones. Las coincidencias de los espectros de los péptidos (PSM) fueron validados utilizando un percolador basado en valores-q de 1% FDR. Los péptidos identificados se agruparon por proteínas mediante el programa Proteome Discoverer, de acuerdo con el principio de parsimonia y se filtraron al 1% de FDR.

III.14.1. Análisis de la bioactividad de los péptidos identificados.

El análisis de los datos obtenidos en la identificación de los péptidos de los hidrolizados se ha llevado a cabo utilizando el programa R versión 3.4.0.

Se extrajeron los péptidos identificados (con alta confianza y sin modificaciones post-traduccionales) para cada muestra, y su respectiva cuantificación en la muestra (las PSMs). Se normalizaron los valores de cuantificación atendiendo al total de PSMs de todos los péptidos de las muestras. De esta manera se hace comparable la cuantificación de un mismo péptido entre distintas muestras.

Por otro lado, se realizó la búsqueda de cada uno de los péptidos identificados en la base de datos de péptidos bioactivos "BIOPEP" (Minkiewicz *et al.*, 2008). Se llevó a cabo dos tipos de búsqueda: la identificación de biopéptidos que ya están en su forma bioactiva en la muestra; y la identificación de biopéptidos potenciales por contener dentro de su estructura primaria secuencias con bioactividad.

Con la información extraída de la base de datos BIOPEP, se agruparon los péptidos según su actividad. Además, según el tipo de bioactividad de los péptidos y su cuantificación en las muestras se realizó la agrupación de los distintos hidrolizados según las bioactividades potenciales mayoritarias.

III.15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la caracterización de la cinética enzimática del extracto de flor de *C. scolymus* L. se llevaron a cabo modelos de regresión lineal con términos cuadráticos y cúbicos de las variables explicativas: temperatura, pH, concentración del extracto enzimático, concentración del sustrato y tiempo de reacción, mediante el programa "R" versión 3.3.1.

En el estudio de los hidrolizados de la caseína bovina y la ovoalbúmina para determinar el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la concentración de péptidos, la proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y la actividad IECA y antioxidante, los datos fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con repetición,

utilizando el programa estadístico Statistica versión 10.0 (StatSoft). El diseño factorial con varias medidas por casilla se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde μ es la media general, T_i es el efecto del tiempo de hidrólisis, P_j es el efecto del peso molecular, TP_{ij} es el efecto de la interacción entre tiempo de hidrólisis y peso molecular y ϵ_{ij} es el error del modelo.

En el estudio comparativo de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina para determinar el efecto del sustrato enzimático utilizado y el peso molecular sobre la concentración de péptidos, la proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y la actividad IECA y antioxidante de los hidrolizados, los datos fueron tratados estadísticamente mediante ANOVA de dos factores con repetición. El diseño factorial con varias medidas por casilla se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + S_i + P_j + SP_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde μ es la media general, S_i es el efecto del sustrato, P_j es el efecto del peso molecular, SP_{ij} es el efecto de la interacción entre sustrato y peso molecular, y ϵ_{ij} es el error del modelo.

En el estudio de la hidrólisis de la leche pasteurizada (de vaca y cabra) para determinar el efecto del tipo de enzima (extracto de flor de alcachofa o cuajo animal) y el peso molecular en la concentración de péptidos, la proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y la actividad IECA y antioxidante de los hidrolizados, los datos fueron tratados estadísticamente mediante ANOVA de dos factores con repetición. El diseño factorial con varias medidas por casilla se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + E_i + P_j + EP_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde μ es la media general, E_i es el efecto del tipo de enzima, P_j es el efecto del peso molecular, EP_{ij} es el efecto de la interacción entre tipo de enzima y peso molecular y, ϵ_{ij} es el error del modelo.

El estudio comparativo del efecto del tratamiento térmico en la leche de cabra en la concentración de péptidos, proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y actividad IECA y antioxidante de los hidrolizados, se realizó mediante análisis estadístico ANOVA de un solo factor.

En el estudio comparativo de los hidrolizados de leche de vaca y cabra pasteurizada obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal, para determinar el efecto de la especie de origen de la leche y el efecto del tipo de enzima utilizado en la hidrólisis sobre la concentración de péptidos, proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y actividad IECA y antioxidante, se realizó un ANOVA de dos factores con repetición. El diseño factorial con varias medidas por casilla se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + S_i + E_j + SE_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde μ es la media general, S_i es el efecto de la especie de origen de la leche, E_j es el efecto tipo de enzima, SE_{ij} es el efecto de la interacción entre la especie de origen de la leche y el tipo de enzima utilizado, y ϵ_{ij} es el error del modelo.

Una vez determinada la existencia de diferencias significativas entre las diferentes variables, se aplicó la prueba LSD (mínima diferencia significativa), para realizar una comparación múltiple de medidas, solamente en aquellos casos en el que el ANOVA fue significativo ($P < 0,05$).

En el estudio de la actividad antibacteriana de los hidrolizados, los datos fueron tratados estadísticamente mediante ANOVA de un solo factor, utilizando el programa estadístico SPSS Statistics versión 21 (IBM) y posteriormente se aplicó el test de Dunnett para determinar la existencia de diferencias entre las medias de las muestras y las medias del control, estableciéndose un nivel de confianza del 95%.

IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE *C. SCOLYMUS* L.: CONTENIDO EN PROTEÍNA Y ACTIVIDAD COAGULANTE.

IV.1.1. Contenido en proteína del extracto soluble en agua de flor de *C. scolymus*. L.

Los valores de contenido en proteína del extracto de alcachofa liofilizado, para cada uno de los lotes de procesado, se recogen en la Tabla IV.1. La media del contenido de proteína (mg) del extracto de alcachofa (p/p) fue: $0,104 \pm 0,01$ (ES). Por cada 100 g de estigmas secos de flor de alcachofa se obtuvo una media de $1,38 \pm 0,28$ g de proteína en el extracto crudo.

Tabla IV. 1. Contenido en proteína (media y desviación estándar) de los diferentes lotes del extracto de alcachofa obtenidos.

Lote	mg proteína (p/p)
1	$0,096 \pm 0,01$
2	$0,125 \pm 0,01$
3	$0,123 \pm 0,00$
4	$0,101 \pm 0,00$
5	$0,074 \pm 0,00$

Si consideramos la proporción proteica de la fracción de cinarasas sobre el total de proteína del tejido vegetal, referida en el trabajo de Sidrach *et al.* (2005), 0.26%, por cada gramo de nuestro extracto liofilizado de flor de *C. scolymus* L., habría presentes aproximadamente unos 2,6 μ g de cinarasas, de los cuales 1,59 μ g pertenecerían a la fracción de cinarasa A. Sidrach *et al.*, (2005) reportaron que de cada 100 g de estigmas secos de flor de alcachofa se obtuvieron 27 g proteína de extracto crudo. A partir de este extracto se purificaron tres fracciones de cinarasas

(A, B y C), siendo la fracción de cinarasa A la más concentrada, conteniendo 4,3 mg de proteína. Las fracciones B y C presentaron 2,2 y 0,6 mg de proteína, respectivamente.

IV.1.2. Actividad coagulante del extracto soluble en agua de flor de *C. scolymus* L. Comparación con la actividad coagulante del cuajo animal.

*IV.1.2.1. Actividad coagulante del extracto soluble en agua de flor de *C. scolymus* L.*

Se han propuesto diversos modelos de cinética de la coagulación de la leche (Hyslop *et al.*, 1979; Kopelman y Cogan, 1976; Payens *et al.*, 1977; van Hooydonk y Walstra, 1987). En la Figura IV.1 se muestra la relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de proteína del extracto de flor de alcachofa ajustados a los cuatro modelos. En la Tabla IV.2 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación obtenidos para cada uno de los modelos alternativos.

La relación entre la concentración de proteína del extracto de flor de *C. scolymus* L. (mg/mL) y el tiempo de coagulación en segundos, se representa en la Figura VI.1 (A). Como se puede observar, la regresión no lineal que aparece concuerda con el modelo propuesto por Payens *et al.* (1977): $tE_0^\gamma=C$, donde t es el tiempo de coagulación y E_0 la concentración de enzima inicial, y donde γ y C son parámetros ajustables. En la Figura IV.1 (B), se ilustra la relación lineal entre la inversa de la concentración y la actividad coagulante de la leche adaptando el modelo propuesto por Hooydonk y Walstra (1987) que postula el tiempo de coagulación como una función del recíproco de la concentración de la enzima. Nuestros datos experimentales también fueron ajustados a los modelos propuestos por Kopelman y Cogan (1976) e Hyslop *et al.* (1979), los cuales correlacionan el inverso del tiempo de coagulación con la concentración de enzima, y el tiempo de coagulación con la inversa de la raíz cuadrada de la concentración enzimática, tal y como se muestra en la Figura IV.1 (C y D).

El tiempo de coagulación de la leche disminuye con el incremento de la concentración de enzima coincidiendo con lo observado por Chitipinityol y Crabbe, (1998). Por otro lado, nuestros resultados de coagulación de la leche con el extracto de flor de *C. scolymus* L. se han adaptado a los cuatro modelos propuestos de cinética de coagulación y se ha observado que nuestros datos

experimentales se ajustan bien a todos ellos. Aunque en todos los casos se ha obtenido un buen coeficiente de determinación, los modelos que mejor que se han ajustado a nuestros datos experimentales son los propuestos por Payens *et al.* (1977) ($R^2= 0,9983$) y van Hooydonk y Walstra (1987) ($R^2= 0,9976$); presentando un peor ajuste al modelo propuesto por Hyslop *et al.* (1979) ($R^2=0,9898$).

Tabla IV. 2. Mejor ajuste para los modelos alternativos de tiempo de coagulación (t) como función de la concentración de proteína del extracto de alcachofa inicial (E_0) y sus coeficientes de determinación.

Mejor modelo	R^2	Referencia
$t = 216,31E_0^{-0,868}$	0,9983	Payens <i>et al.</i> (1977)
$t = 17,005E_0^{-1} + 24,497$	0,9976	van Hooydonk y Walstra (1987)
$t^{-1} = 0,0408E_0 + 0,0009$	0,9934	Kopelman y Cogan (1976)
$t = 112,36E_0^{-1/2} - 142,18$	0,9898	Hyslop <i>et al.</i> (1979)

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en trabajos anteriores como el de Chazarra *et al.* (2007), utilizando tres fracciones purificadas de cinarasas (A, B y C) a partir de un extracto crudo de *C. scolymus* L., o el de Silva y Malcata en 2005, a partir de un extracto de flor de cardo (*C. cardunculus*). En ambos estudios, los modelos que mostraron un mejor ajuste fueron los propuestos por Payens *et al.* (1977) y van Hoodydonk y Waltra (1987).

En el caso del extracto obtenido de flor de *C. scolymus* L., una unidad de coagulación (U.C.), definida como la cantidad de proteína necesaria para coagular 10 mL de leche a 30°C en 100 segundos, se correspondió a 2,23 mg de proteína del extracto (0,22 mg/mL). Para el mismo tiempo de coagulación (100 segundos), las concentraciones necesarias de cardosinas purificadas extraídas de flor de cardo (*C. cardunculus*), fueron: 0,10 mg/mL para la cardosina A, 0,003 mg/mL para la cardosina B y 0,006 mg/mL para la mezcla de cardosina A y B (ratio 2:1) (Silva y Malcata, 2005). Estos valores de concentración son menores al encontrado para el extracto de alcachofa, pero hay que considerar que, en nuestro caso, estamos trabajando con un extracto bruto sin purificar.

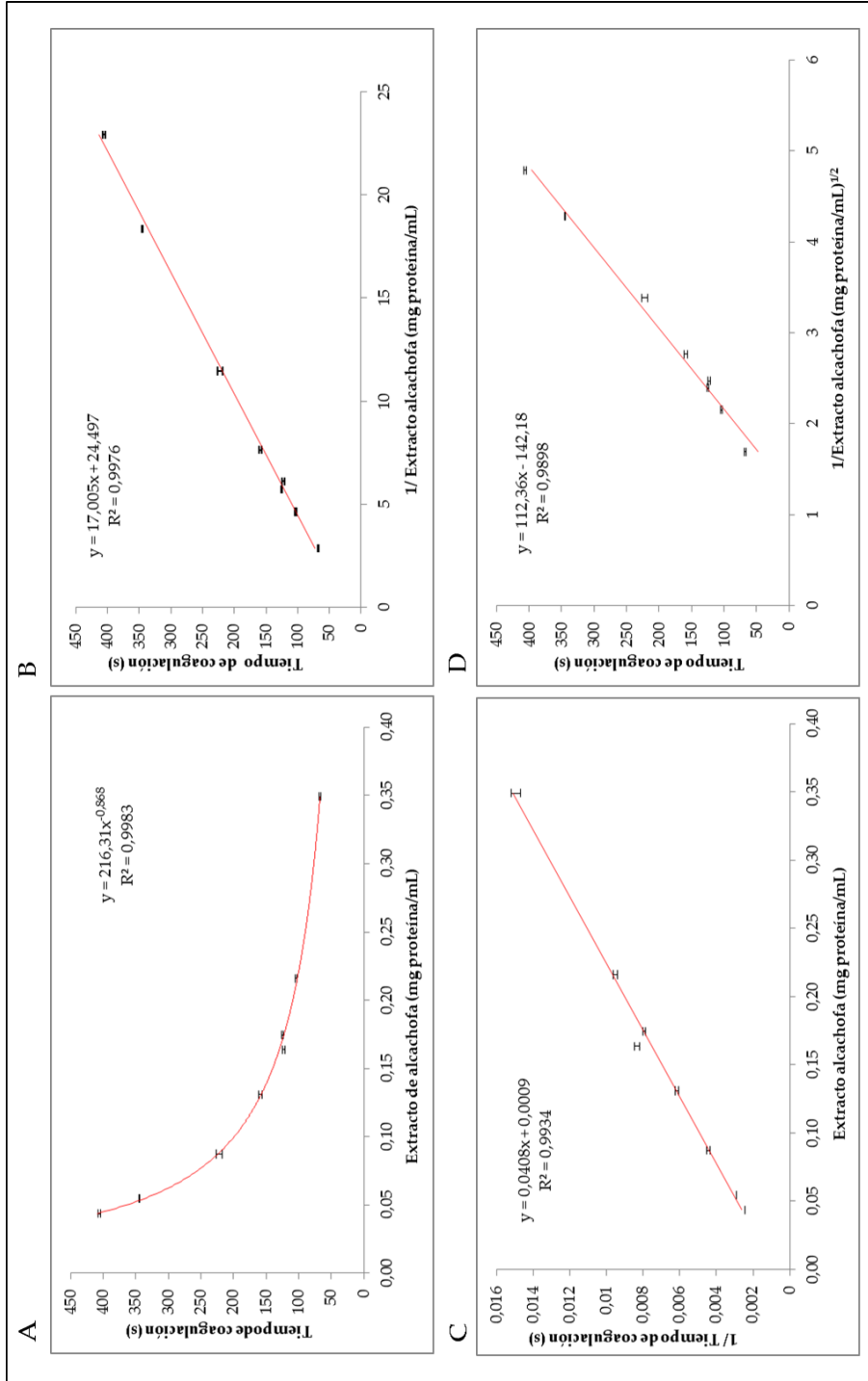


Figura IV. 1. Relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de proteína del extracto de flor de alcachofa. (A: modelo de Payens *et al.*; B: modelo Hooydonk y Walstra (1987); C: modelo de Kopelman y Cogan (1976); D: modelo de Hyslop *et al.* (1979)).

IV.1.2.2. *Actividad coagulante del cuajo animal comercial.*

Las relaciones entre la concentración del cuajo animal (mg/mL) y el tiempo de coagulación (segundos), a través de los cuatro modelos descritos en el apartado 1.1.2.2. se representan en la Figura IV.2. En la Tabla IV.3, se muestran las ecuaciones y los coeficientes de determinación obtenidos para cada uno de los modelos alternativos.

En el caso del cuajo animal comercial utilizado (50% quimosina, 50% pepsina) los modelos que mejor se ajustaron a nuestros datos fueron el de van Hooydonk y Walstra (1987) ($R^2=0,9993$) y el de Payens *et al.* ($R^2=0,9970$), consiguiendo un peor coeficiente de determinación con el modelo propuesto por Hyslop *et al.* (1979) ($R^2=0,9795$). Por otro lado, Veríssimo *et al.* (1995) describieron que el modelo cinético de coagulación que mejor se adaptó a la quimosina fue el propuesto por Payens *et al.* (1977).

Tabla IV. 3. Mejor ajuste para los modelos alternativos de tiempo de coagulación (t) como función de la concentración de cuajo animal comercial (E_0) y sus coeficientes de determinación.

Mejor modelo	R^2	Referencias
$t = 376,75E_0^{-0,799}$	0,9970	Payens <i>et al.</i> (1977)
$t = 325,81E_0^{-1} + 43,236$	0,9993	van Hooydonk y Walstra (1976)
$t^{-1} = 0,0017E_0 + 0,0011$	0,9902	Kopelman y Cogan (1976)
$t = 567,75E_0^{-1/2} - 166,26$	0,9795	Hyslop <i>et al.</i> (1979)

Una unidad de coagulación (U.C.) correspondió a 57,4 mg de cuajo (5,74 mg/mL). Por lo tanto, nuestro extracto soluble en agua de alcachofa tuvo mucha más actividad coagulante, aproximadamente unas 25 veces mayor, que la obtenida para el cuajo animal comercial.

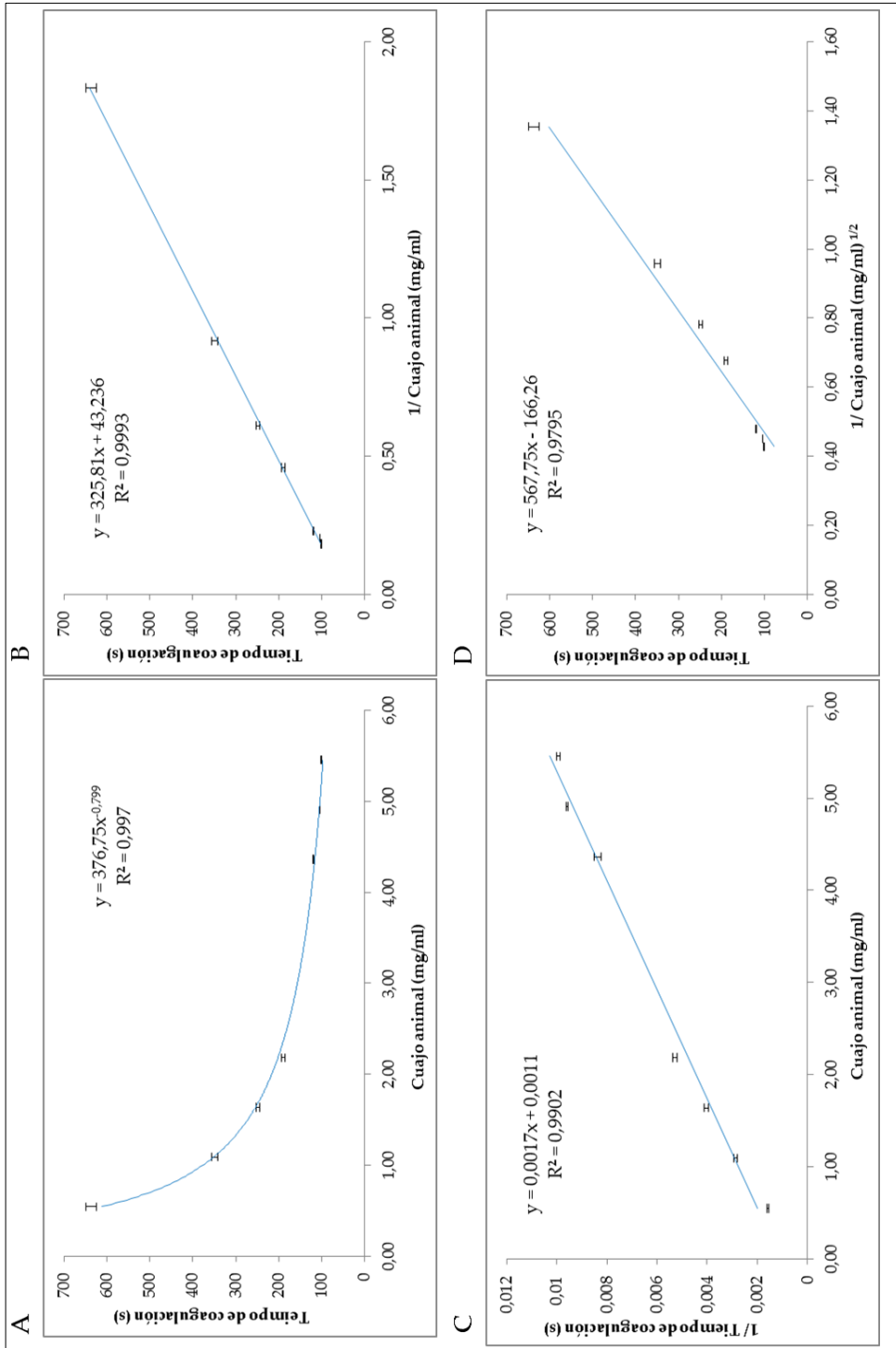


Figura IV. 2. Relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de cuajo animal. A: modelo de Payens *et al.*; B: modelo Hooydonk y Walstra (1987); C: modelo de Kopelman y Cogan (1976); D: modelo de Hyslop *et al.* (1979).

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L. EN CASEÍNA BOVINA.

Se analizó el efecto de la temperatura, el pH, la concentración de proteína del extracto de *C. scolyms* L., así como del tiempo de hidrólisis, en la actividad proteolítica de dicho extracto utilizando como sustrato caseína comercial bovina. Para el estudio de la influencia de estos parámetros en la cinética enzimática, se llevaron a cabo modelos de regresión lineal múltiple con términos cuadráticos y cúbicos de las variables explicativas. A partir de las condiciones óptimas de hidrólisis determinadas, se estimó el valor de K_M y velocidad máxima de la reacción enzimática.

IV.2.1. Efecto de la temperatura.

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las temperaturas estudiadas se representa en la Figura IV.3. Asimismo, en la Tabla IV.4 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas temperaturas ensayadas.

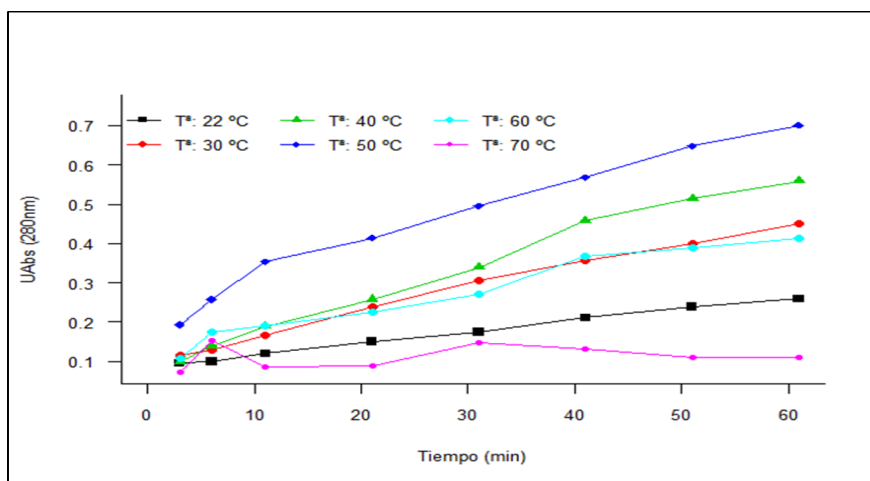


Figura IV. 3. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada una de las temperaturas ensayadas.

Tabla IV. 4. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la caseína a distintas temperaturas de ensayo.

Temperatura	Ecuación de la recta	R^2
22°C	$y = 0,0861 + 0,0029x$	99,63%
30°C	$y = 0,1096 + 0,0059x$	99,13%
40°C	$y = 0,0900 + 0,0081x$	98,92%
50°C	$y = 0,2042 + 0,0088x$	97,51%
60°C	$y = 0,1234 + 0,0051x$	96,25%
70°C	$y = 0,1019 + 0,0003x$	6,05%

Se estableció un modelo de regresión donde la velocidad de proteólisis (expresada en $\text{mU Abs} \cdot \text{min}^{-1}$) en función de la temperatura en grados centígrados (T), es igual a: $-13.92 + 1.02T - 0.01T^2$ ($R^2=0.9912$), donde T varía la velocidad de reacción en 1.02 ± 0.06 ($P=0.0005$), y T^2 lo hace -0.01 ± 0.00 ($P=0.0006$), tal y como se muestra en la Figura IV.4.

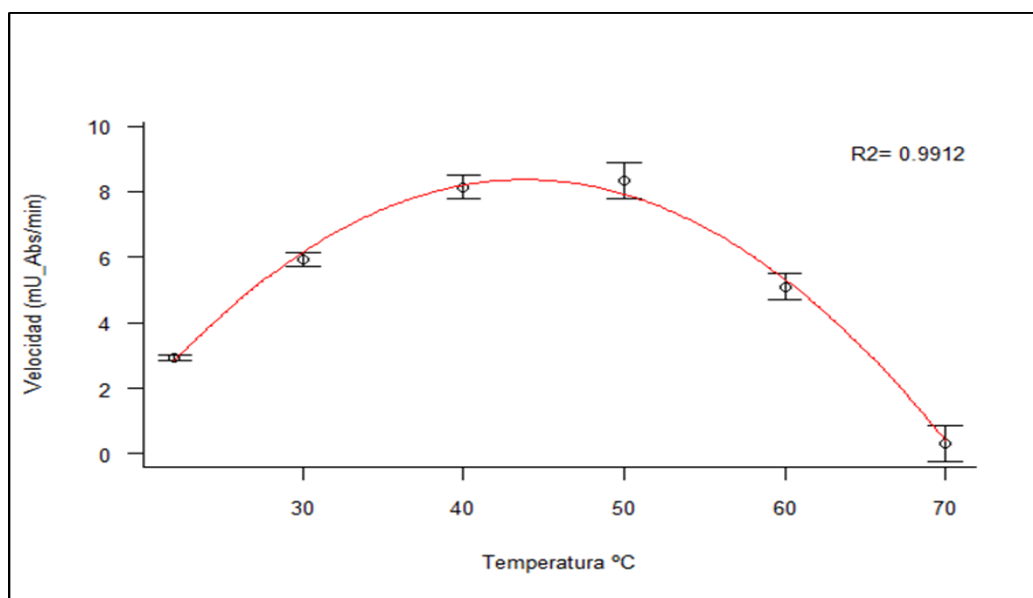


Figura IV. 4. Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolymus* L. en la caseína bovina.

La actividad proteolítica del extracto de flor de alcachofa varió con la temperatura de manera significativa (P para $T=0.0005$; P para $T^2=0.0006$), aumentando hasta los 50°C. Superándose éstos, la actividad disminuyó notoriamente, siendo prácticamente nula a los 70°C.

Se consideró que el rango óptimo de temperatura para la proteólisis de la caseína bovina es 40-50°C. Este rango de temperatura es coherente con los resultados obtenidos por diferentes autores en la caracterización de la estabilidad térmica de las proteinasas aspárticas obtenidas del género *Cynara* (Llorente *et al.*, 2004; Sidrach *et al.*, 2005; Chazarra *et al.*, 2007).

Así, Llorente *et al.* (2004) hallaron que la actividad caseinolítica permanecía prácticamente inalterada después de 3 horas de hidrólisis a 37°C, y todavía era elevada después de 3 horas a 45°C, con un 70% de actividad total. Sin embargo, la exposición de la enzima a 55 °C dio lugar a un rápido descenso de su actividad residual (56% a los 10 minutos, y 18% a las 3 horas) y a 65°C, cayó abruptamente al 27% en los cinco primeros minutos de hidrólisis.

En el trabajo realizado por Sidrach *et al.* (2005), se utilizó un péptido comercial, el [H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH], dentro del cual la secuencia fenilalanil-*p*-nitrofenilalanina se presenta como sitio reactivo. En este estudio se muestra una retención total de la actividad de la cinarasa A después de una hora de incubación a 50°C. Sin embargo, a los 60°C la enzima se inactiva rápidamente presentando menos de un 20% de actividad residual tras 60 minutos de incubación. A 70°C la actividad disminuye drásticamente en los primeros diez minutos de incubación, produciéndose una inactivación prácticamente inmediata a los 80°C.

Chazarra *et al.* (2007) utilizaron el extracto de estigmas de flores secas de *C. scolymus* L. para analizar su actividad como coagulante, evidenciándose una disminución del tiempo de coagulación progresivamente al aumento de temperatura de 30 a 60°C, siendo éste considerablemente menor entre 40 y 60°C. Este rango de temperatura óptimo sobre la actividad coagulante del extracto de flor de alcachofa es similar al obtenido en nuestro estudio sobre la actividad proteolítica del extracto.

En el caso del cardo (*Cynara cardunculus* L.), Vieira de Sá y Barbosa (1972) describieron la estabilidad de las proteinasas obtenidas a altas temperaturas,

mostrando un aumento de su actividad coagulante hasta los 70°C. Por encima de esta temperatura la actividad cae, y si se superan los 75°C desaparece completamente. Como se puede apreciar, esta temperatura óptima de coagulación es superior a la obtenida para la actividad proteolítica del extracto de flor de *C. scolymus* L.

IV.2.2. Efecto del pH

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada uno de los pHs estudiados se representa en la Figura IV.5. Asimismo, en la Tabla IV.5 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para los distintos pHs ensayados.

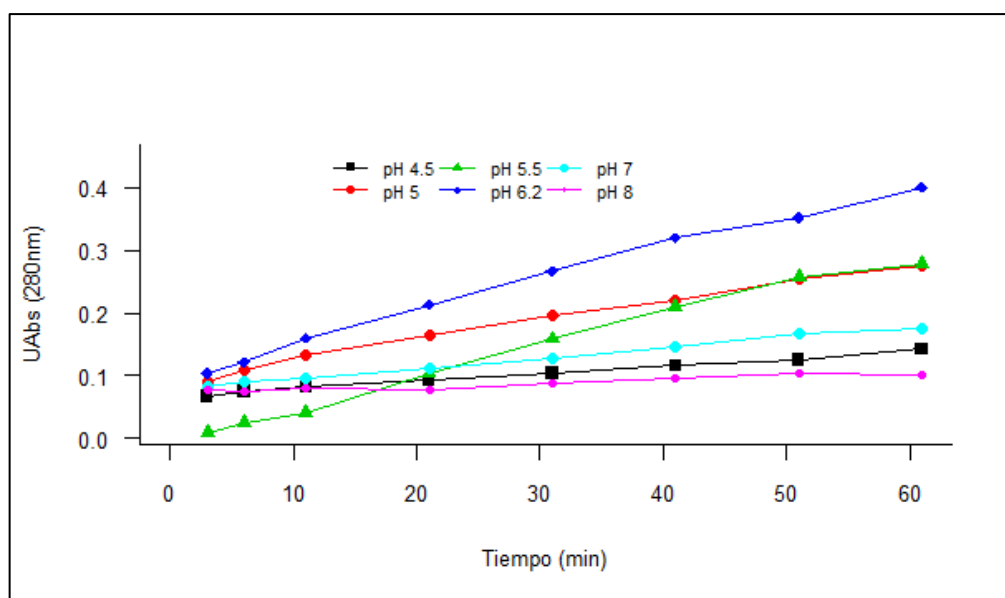


Figura IV. 5. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada uno de los pHs ensayados.

Se estableció un modelo de regresión donde la velocidad de proteólisis (expresada en $\text{mUAbs}\cdot\text{min}^{-1}$) en función del pH es igual a: $-45.43 + 16.81\text{pH} - 1.42\text{pH}^2$ ($R^2=0.727$), donde el pH varía la velocidad de reacción en 16.81 ± 6.05 ($P=0.0691$), y pH^2 lo hace en -1.42 ± 0.50 ($P=0.0672$), tal y como se muestra en la Figura IV.6.

Tabla IV. 5. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la caseína a distintos pHs.

pH	Ecuación de la recta	R^2
4,5	$y = 0,0663 + 0,0012x$	99,26%
5	$y = 0,0923 + 0,0031x$	99,15%
5,5	$y = -0,0030 + 0,0049x$	99,05%
6,2	$y = 0,0990 + 0,0051x$	99,29%
7	$y = 0,0790 + 0,0016x$	99,47%
8	$y = 0,0729 + 0,0005x$	90,30%

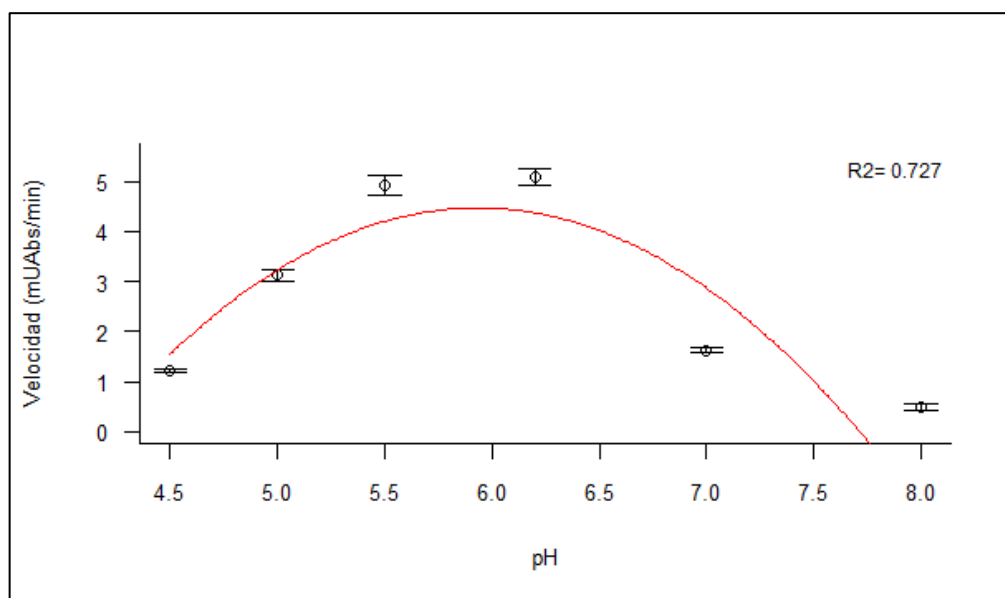


Figura IV. 6. Variación de la velocidad de proteólisis de la caseína por el extracto de flor de *C. scolymus* L. en función del pH.

La actividad enzimática del extracto de flor de alcachofa varió con el pH mostrando mayor actividad proteolítica a los pHs 5.5 y 6.2. A pH 5 presentó un 62% de la actividad proteolítica máxima observada, siendo inferior al 35% para el resto de pHs estudiados y disminuyendo al 10% a pH 8. Estos resultados están relacionados con la naturaleza de las enzimas presentes en el extracto, ya que las

cinarasas son aspartato proteasas y su pH de acción se encuentra en el rango de pH ácido (Sidrach *et al.*, 2005).

Este rango de pH óptimo es coherente con los resultados obtenidos por diferentes autores. Así, en el trabajo desarrollado por Llorente *et al.* (2004) la actividad proteolítica máxima se alcanzó a pH ácido, mostrando una actividad mayor al 95% en el rango de pH de 4.5 a 5.5, utilizando como sustrato hemoglobina bovina o azocaseína. Sidrach *et al.* (2005) describieron una actividad máxima para la cinarasa A a pH de 5.0 utilizando como sustrato el péptido [H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH], disminuyendo a un 40% de su actividad óptima a pH 3.0 y a un 10% a pH 7. El rango de pH óptimo (5.5-6.2) obtenido para la actividad proteolítica sobre la caseína bovina del extracto de flor de *C. scolyms* L. es similar al descrito por Chazarra *et al.* (2007) en la caracterización de la actividad coagulante de cinarasas purificadas a partir de un extracto de flores secas de alcachofa, donde el incremento en el tiempo de coagulación fue mayor cuando el pH cambiaba de 6.3 a 7.0, perdiendo el 87% de su actividad, mientras que el tiempo de coagulación disminuía cuando bajaba el pH de 6.3 a 5.5.

Asimismo, los resultados obtenidos en el presente trabajo para el extracto soluble en agua de flor de *C. scolyms* L., están relacionados con los descritos para las proteinasas procedentes del cardo (*C. cardunculus* L.): 5.0 (Verissimo *et al.*, 1996) y 5.1 (Heimgartner *et al.*, 1990); aunque en el caso del cardo australiano el pico de actividad máxima se encontró a pH 6.0 (Chen *et al.*, 2003).

IV.2.3. Efecto de la concentración de extracto de flor de *C. scolyms* L.

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de extracto estudiadas se representa en la figura IV.7. Asimismo, en la tabla IV.6 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R²) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas concentraciones ensayadas.

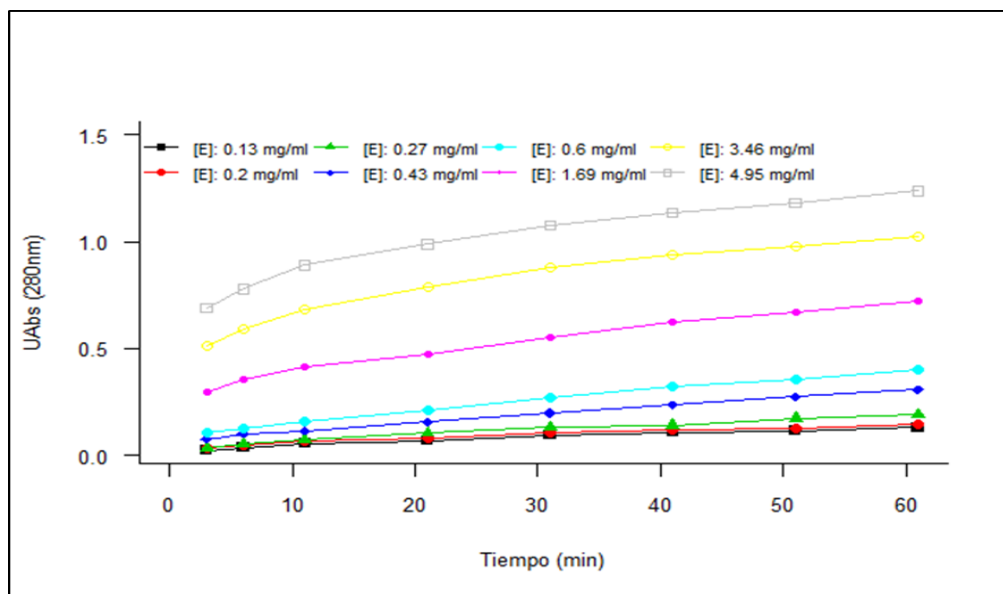


Figura IV. 7. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de proteína del extracto de *C. scolymus* L. ensayadas.

Tabla IV. 6. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la caseína a distintas concentraciones de proteína del extracto.

Proteína (mg/mL)	Ecuación de la recta	R^2
4,95	$y = 0,7493 + 0,0088x$	92,98%
3,46	$y = 0,5593 + 0,0085x$	93,47%
1,69	$y = 0,3150 + 0,0070x$	97,87%
1,19	$y = 0,2110 + 0,0063x$	95,80%
0,6	$y = 0,0990 + 0,0051x$	99,29%
0,43	$y = 0,0720 + 0,0039x$	99,73%
0,27	$y = 0,0369 + 0,0026x$	97,89%
0,20	$y = 0,0402 + 0,0018x$	97,63%
0,13	$y = 0,0300 + 0,0017x$	95,07%

Se estableció un modelo de regresión en el que la velocidad de proteólisis (expresada en mU Abs min^{-1}) en función de la concentración de proteína del extracto enzimático (E), es igual a: $1.96 + 4.11E - 0.57E^2$ ($R^2=0.9158$), donde dicha concentración varía la velocidad de reacción en 4.11 ± 0.87 ($P=0.0053$), y E^2 lo hace en: -0.57 ± 0.18 ($P=0.0259$), tal y como se muestra en la Figura IV.8.

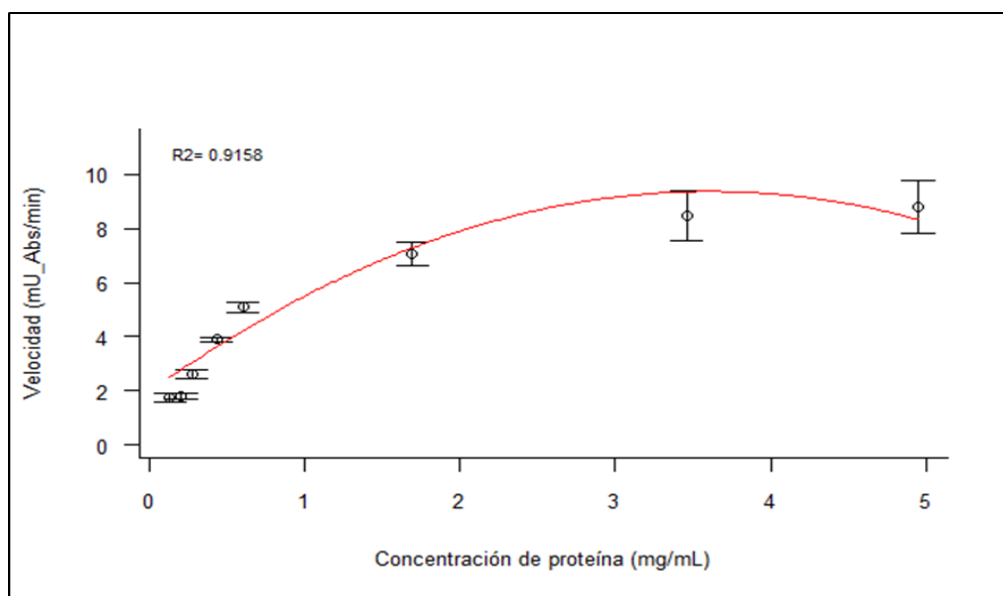


Figura IV. 8. Efecto de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymus* L. en la velocidad de proteólisis de la caseína bovina.

La actividad enzimática del extracto de flor de alcachofa sobre la caseína bovina, varió con la concentración en proteína del extracto de manera significativa (P para $E= 0.0053$; P para $E^2=0.0259$), presentando mayor actividad proteolítica a medida que aumentaba dicha concentración.

Se observó también una relación lineal entre la velocidad y la concentración de proteína del extracto hasta alcanzar los 0,60 mg de proteína/mL de inóculo (Figura IV.9), es decir $23\mu\text{g}$ de proteína del extracto enzimático/mL de solución de caseína al 1%. A partir de esta concentración la actividad proteolítica tiende a estabilizarse, por lo que consideramos que ésta podría ser la concentración de extracto óptima para llevar a cabo de forma eficiente las hidrólisis de la caseína bovina para la obtención de péptidos en las condiciones de ensayo establecidas.

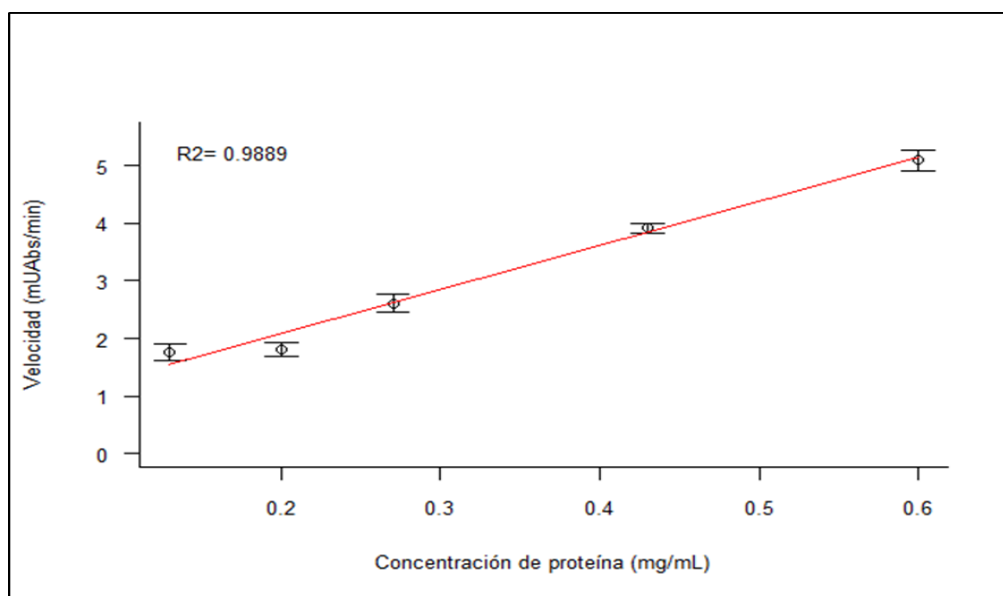


Figura IV. 9. Relación lineal de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymus* L. en la velocidad de proteólisis de la caseína bovina.

IV.2.4. Efecto de la concentración de sustrato. Estimación de $V_{\text{máx}}$ y K_M

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de caseína, utilizando una concentración del extracto enzimático de 0.6 mg proteína/mL de extracto, se representa en la Figura IV.10. Asimismo, en la Tabla IV.7 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas.

La velocidad de la reacción aumenta a medida que se incrementa la concentración de sustrato hasta estabilizarse a partir de los 10,0 mg de caseína/mL, como se puede observar en los valores de los coeficientes de regresión (pendiente de la recta) correspondientes a las diferentes concentraciones de sustrato.

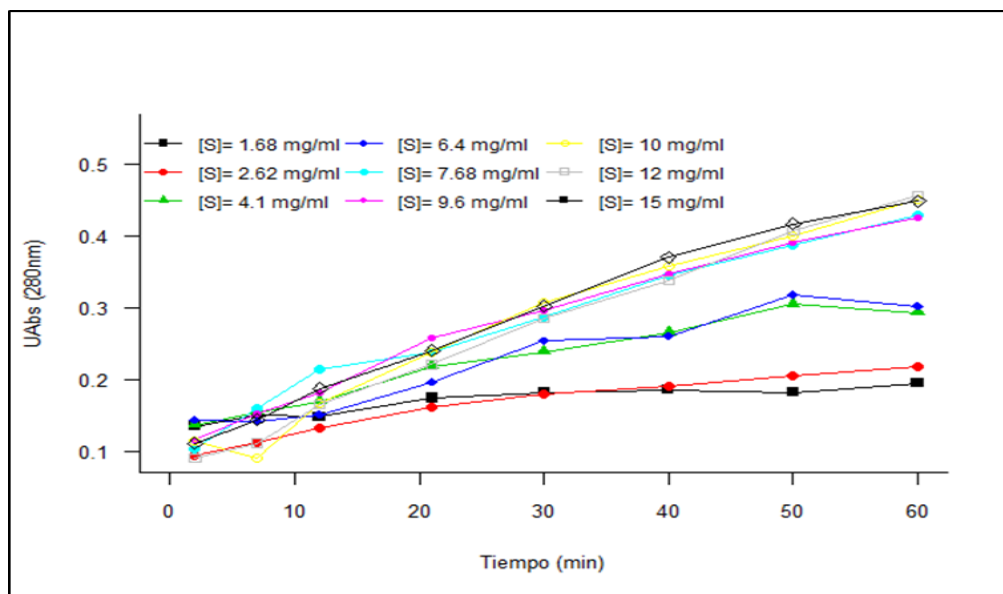


Figura IV. 10. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción del extracto de flor de *C. scolyms* L. sobre la caseína para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas.

Tabla IV. 7. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolyms* L. sobre la caseína a distintas concentraciones de sustrato.

Caseína (mg/mL)	Ecuación de la recta	R^2
15,00	$y = 0,1105 + 0,0060x$	98,86%
12,00	$y = 0,0806 + 0,0064x$	99,54%
10,00	$y = 0,0978 + 0,0062x$	97,71%
9,60	$y = 0,1215 + 0,0054x$	98,38%
7,68	$y = 0,1228 + 0,0053x$	97,74%
6,40	$y = 0,1154 + 0,0040x$	95,41%
4,10	$y = 0,1277 + 0,0036x$	97,78%
2,62	$y = 0,1019 + 0,0021x$	93,43%
1,68	$y = 0,1421 + 0,0010x$	82,71%

Respecto a la estimación de la velocidad máxima y a la K_M , las cinarasas de la alcachofa presentes en el extracto obtenido, mostraron un comportamiento michaeliano ($R^2=0.9802$), tal y como se muestra en la Figura IV.11. Estos resultados son similares a los obtenidos en cardos silvestres y para la quimosina o renina (Veríssimo *et al.*, 1995; Ramalho-Santos *et al.*, 1996) al igual que el observado por Sidrach *et al.* (2005) en la cinarasa A purificada utilizando como sustrato un péptido comercial ([H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH]) estimando un valor de $V_{m\acute{a}x}$ de $8,2 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ y de K_M de $70,3 \mu\text{M}$.

El valor de $V_{m\acute{a}x}$ estimado para nuestro extracto crudo de flor de *C. scolymus* L. sobre el sustrato de caseína fue de $8,47 \pm 0,50 \text{ mUAbs}\cdot\text{min}^{-1}$ y el de K_M de $5,658 \pm 0,98 \text{ mg/mL}$. Este valor informa sobre la concentración de sustrato a la cual se produce la reacción enzimática a la mitad de la velocidad máxima, por lo tanto, para conseguir trabajar a la máxima velocidad de proteólisis tendremos que utilizar una concentración de sustrato de $11,316 \text{ mg}$ de caseína/mL (aproximadamente un 1%).

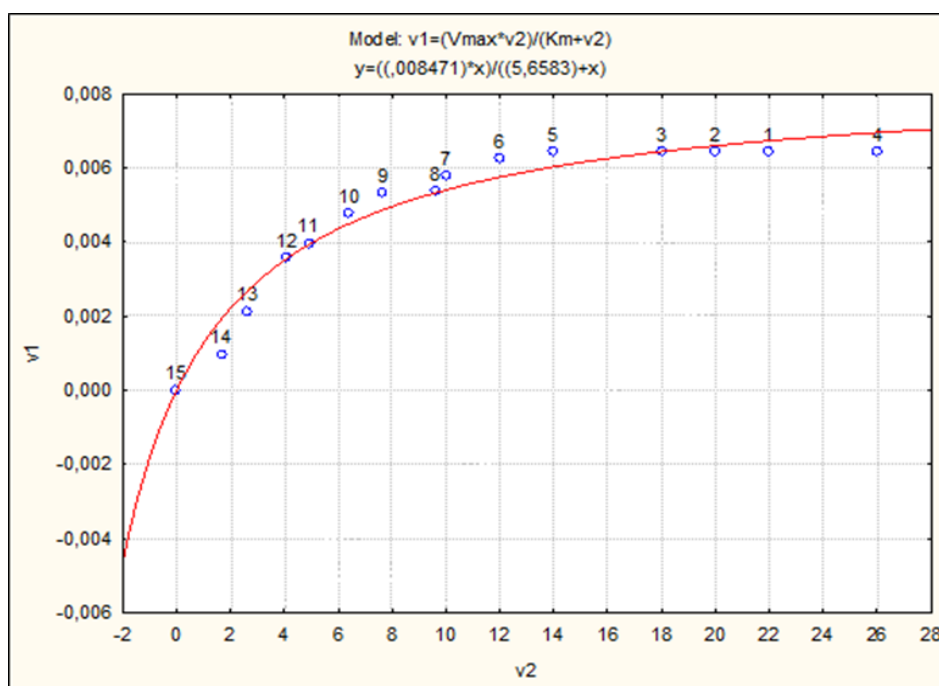


Figura IV. 11. Velocidad de la actividad proteolítica ($v1$:UAbs a 280 nm) del extracto de *C. scolymus* L. a diferentes concentraciones de sustrato ($v2$: mg/mL).

IV.2.5. Actividad enzimática durante 24 horas.

La relación entre el producto de la reacción enzimática (correlacionado con la absorbancia) y el tiempo de reacción durante 24 horas se representa en la Figura IV.12. Se estableció un modelo de regresión donde la concentración de péptidos solubles en agua (expresada en UAbs) en función del tiempo en minutos (t), es igual a: $0.11 + 1.94 \cdot 10^{-3}t - 1.54 \cdot 10^{-6}t^2 + 4.18 \cdot 10^{-10}t^3$ ($R^2=0.9928$), donde t varía la concentración de producto en $1.94 \cdot 10^{-3} \pm 1.21 \cdot 10^{-4}$ ($P= 3.95 \cdot 10^{-12}$), t^2 lo hace en $-1.54 \cdot 10^{-6} \pm 2.03 \cdot 10^{-7}$ ($P=5.30 \cdot 10^{-7}$), y t^3 en $4.18 \cdot 10^{-10} \pm 9.25 \cdot 10^{-11}$ ($P=0.000267$).

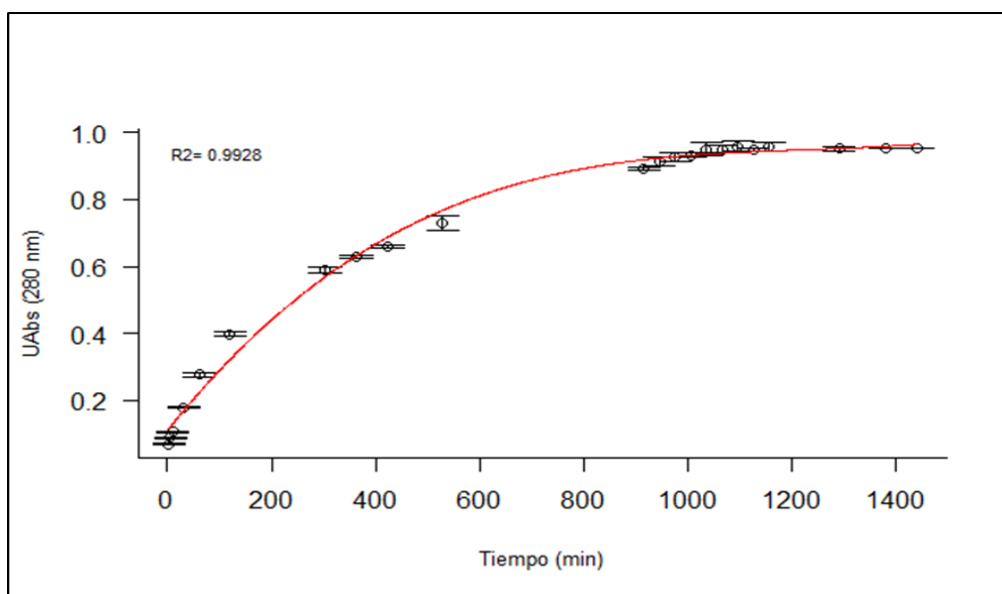


Figura IV. 12. Variación de la concentración de péptidos solubles en agua por la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la caseína en función del tiempo de reacción.

La concentración de péptidos solubles en agua, producto de la hidrólisis enzimática de la caseína por las cinasas presentes en el extracto de flor de *C. scolymus* L. , fue aumentando con el tiempo de incubación hasta las 17 horas (1035 minutos), tiempo a partir del cual empezó a estabilizarse. Este patrón es comparable al mostrado por las cardosinas A y B del cardo (*C. cardunculus* L.) en el estudio realizado por Silva y Malcata (2005) donde se llevaron a cabo hidrólisis de caseína ovina y caprina con las enzimas purificadas, aisladas y combinadas, y

sometiéndolas a incubación previa a las condiciones de maduración del queso. Se describió una estabilización de la producción de la hidrólisis entre las 3 y las 6 horas de tiempo de reacción, produciéndose mayor proteólisis con la caseína caprina.

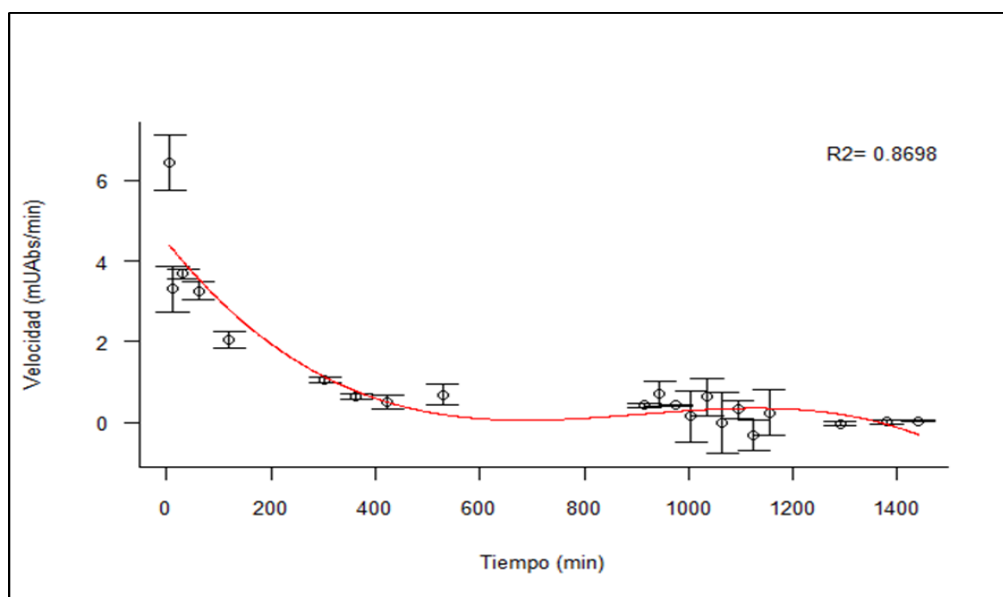


Figura IV. 13. Variación de la velocidad de la actividad proteolítica de la caseína del extracto del flor de *C. scolymus* L. con el tiempo de reacción.

Con el tiempo de reacción disminuyó de manera significativa la velocidad de proteólisis de la caseína, dada ésta como la diferencia de absorbancia por minuto entre mediciones, tal y como se representa en la Figura IV.13. Para explicar la relación de la velocidad de proteólisis con el tiempo de reacción (t), se puede considerar el siguiente modelo de regresión cúbico para el que la velocidad es igual a: $4.48 - 1.62 \cdot 10^{-2}t + 1.89 \cdot 10^{-5}t^2 - 6.95 \cdot 10^{-9}t^3$ ($R^2=0.8698$). Donde la velocidad varía en función de t en $-1.62 \cdot 10^{-2} \pm 2.72 \cdot 10^{-3}$ ($P=1,60 \cdot 10^{-5}$), para t^2 : $1.89 \cdot 10^{-5} \pm 4.48 \cdot 10^{-6}$ ($P=5,71 \cdot 10^{-4}$), y para t^3 : $-6.95 \cdot 10^{-9} \pm 2.02 \cdot 10^{-9}$ ($P=3,13 \cdot 10^{-3}$).

La velocidad fue máxima durante los primeros minutos de reacción, bajando prácticamente a la mitad cuando se alcanzaron los 11 minutos de hidrólisis. Transcurridas dos y seis horas de incubación (120 y 363 minutos), la

velocidad descendió a un 30% y 10% de la velocidad inicial, respectivamente. A las 17 horas se alcanzó una disminución de la velocidad de un 99%.

A la vista de estos resultados, prolongar la hidrólisis de la caseína con extracto de flor de *C. scolymus* L. más allá de las 17 horas de tiempo de reacción a las condiciones estudiadas, no daría lugar a un balance rentable de inversión tiempo/beneficio, ya que a partir de este momento la velocidad de proteólisis es prácticamente nula.

IV.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO SOLUBLE EN AGUA DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L. EN OVOALBÚMINA.

Se analizó el efecto de la temperatura, del pH, de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymus* L., así como del tiempo de hidrólisis, en la actividad proteolítica de dicho extracto utilizando como sustrato ovoalbúmina comercial. Para el estudio de la influencia de estos parámetros en la cinética enzimática, se llevaron a cabo modelos de regresión lineal múltiple con términos cuadráticos y cúbicos de las variables explicativas. A partir de las condiciones óptimas de hidrólisis determinadas, se estimó la K_M y velocidad máxima de la reacción enzimática.

A diferencia con la caseína bovina como sustrato, no se han encontrado estudios de caracterización de la cinética enzimática de cinasas sobre la ovoalbúmina; aunque sí hay muchos trabajos publicados sobre la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas del huevo utilizando distintas enzimas de origen animal, vegetal, fúngico o microbiano (Miguel *et al.*, 2004; Memarpoor-Yazdi *et al.*, 2012a, 2012b; Nimalaratne *et al.*, 2015; Pokora *et al.*, 2014; Rawendra *et al.*, 2013).

IV.3.1. Efecto de la temperatura.

En el caso en concreto del estudio del efecto de la temperatura en la actividad proteolítica del extracto de flor de alcachofa sobre la ovoalbúmina, se realizaron los ensayos sobre dos concentraciones de sustrato: 1% y 0,5%; ya que el comportamiento del extracto enzimático para la concentración de sustrato del 1% fue irregular cuando se ensayaron temperaturas superiores a los 36°C.

IV.3.1.1. Efecto de la temperatura a la concentración de sustrato del 1%.

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las temperaturas estudiadas se representa en la Figura IV.14. Asimismo, en la Tabla IV.8 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas temperaturas ensayadas.

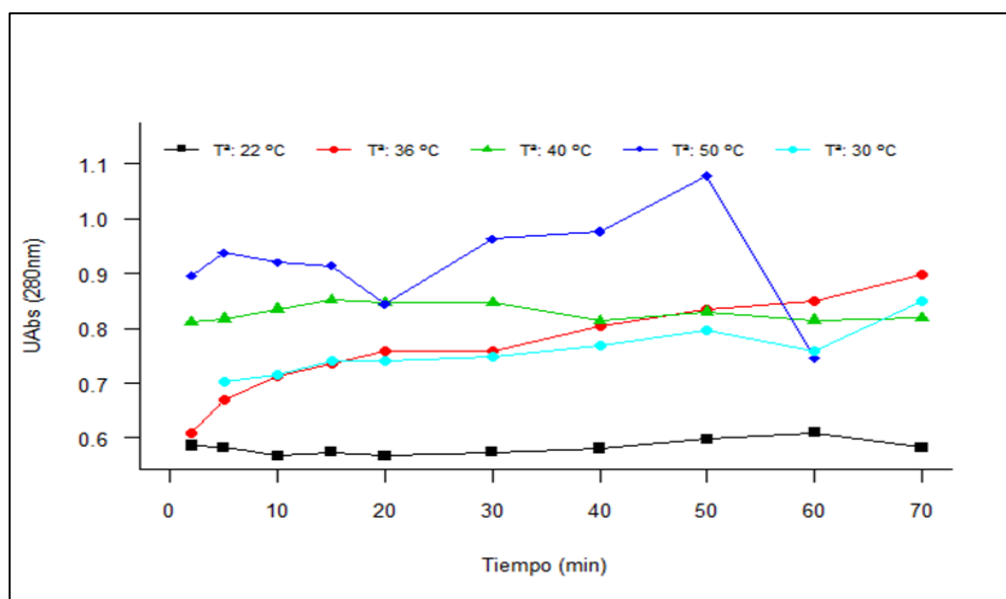


Figura IV. 14. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) en función del tiempo de reacción para cada una de las temperaturas ensayadas.

Tabla IV. 8. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina al 1% a distintas temperaturas de ensayo.

Temperatura	Ecuación de la recta	R^2
22°C	$y = 0,5702 + 0,0005x$	46,51%
30°C	$y = 0,7001 + 0,0018x$	96,92%
36°C	$y = 0,6787 + 0,003x$	88,63%
40°C	$y = 0,8407 - 0,0003x$	2,16%
50°C	$y = 0,923 - 0,0001x$	0,11%

Se observó el incremento de la pendiente con el aumento de la temperatura hasta los 36°C. A 40°C y 50°C la actividad proteolítica se comportó de manera irregular, no ajustándose a una regresión lineal y presentando pendiente negativa, tal y como se muestra en la Figura IV.15, por lo que estas temperaturas no serían adecuadas en la hidrólisis de la ovoalbúmina en la producción de péptidos. Esto puede deberse a que estas temperaturas elevadas, unidas a la incubación continua a tiempos prolongados, producen la coagulación de la ovoalbúmina al 1%. La ovoalbúmina nativa posee un puente disulfuro y cuatro grupos sulfhidrilo libres, cuya reactividad aumenta sobre la desnaturalización inducida por la temperatura y el pH (Mine, 1996), produciéndose formación de agregados. Así, Quirós *et al.* (2007a) describieron la aparición de agregados en la hidrólisis de la ovoalbúmina con pepsina, tripsina y quimotripsina a 37°C, que se correspondieron con dímeros proteicos.

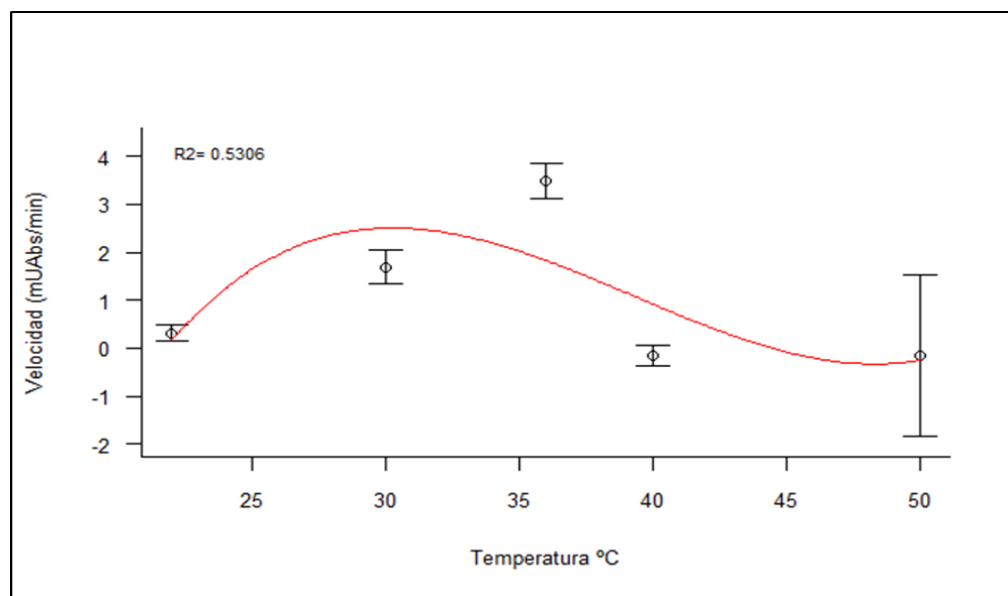


Figura IV. 15. Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolyms* L. en la ovoalbúmina al 1%.

IV.3.1.2. Efecto de la temperatura sobre la concentración de sustrato al 0,5%.

La relación entre la absorbancia y el tiempo de incubación para cada una de las temperaturas estudiadas se representa en la Figura IV.16. Asimismo, en la Tabla IV.9 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas temperaturas ensayadas.

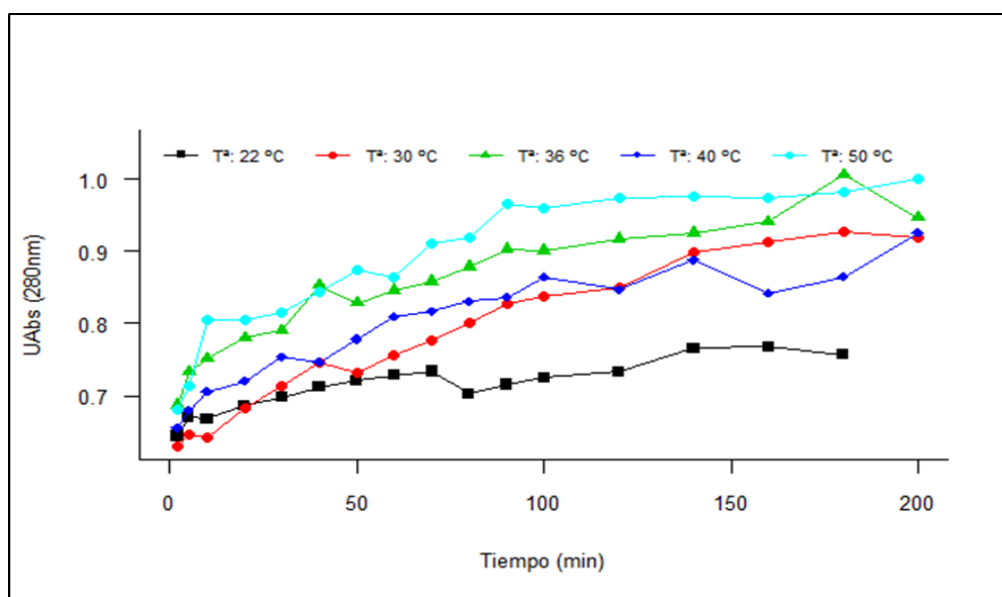


Figura IV. 16. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de reacción del extracto de alcachofa *C. scolymus* L. frente a la ovoalbúmina al 0,5%.

Tabla IV. 9. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre ovoalbúmina al 0,5% a distintas temperaturas de ensayo.

Temperatura	Ecuación de la recta	R^2
22°C	$y = 0,6565 + 0,0068x$	83,93%
30°C	$y = 0,6044 + 0,0197x$	98,49%
36°C	$y = 0,7453 + 0,0014x$	90,65%
40°C	$y = 0,7078 + 0,0011x$	83,69%
50°C	$y = 0,7837 + 0,0016x$	92,40%

Se estableció un modelo de regresión donde la velocidad de proteólisis (expresada en $\text{mUAbs}\cdot\text{min}^{-1}$) en función de la temperatura en grados centígrados (T), es igual a: $-20.92 + (1.92 - 5.33\cdot 10^{-2}T + 4.77\cdot 10^{-4}T^2)T$, ($R^2=0.9887$)

, donde T varía la velocidad de reacción en $1.92 \pm 2.43\cdot 10^{-1}$ ($P=0.0803$), T^2 lo hace $-5.33\cdot 10^{-2} \pm 7.06\cdot 10^{-3}$ ($P=0.0838$), y T^3 en $4.77\cdot 10^{-4} \pm 6.55\cdot 10^{-5}$ ($P=0.0870$), tal y como se representa en la Figura IV.17.

Cuando se utilizó la ovoalbúmina comercial al 0,5%, el extracto enzimático mostró su actividad máxima a 30°C , como se puede observar en la Figura IV.7, y ésta disminuyó ligeramente hasta los 40°C , volviendo a ascender de manera débil a los 50°C .

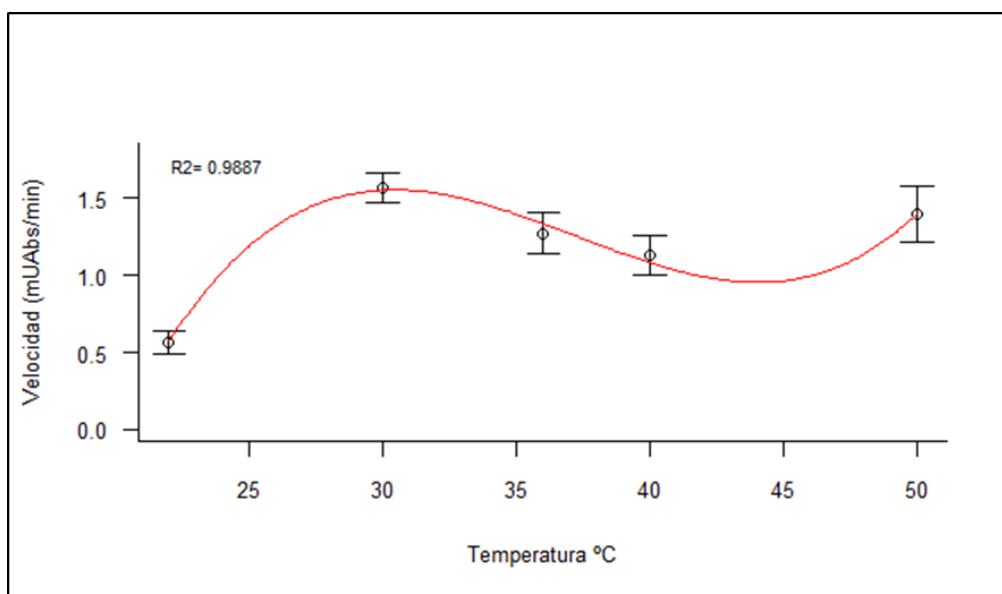


Figura IV. 17. Efecto de la temperatura en la velocidad de proteólisis del extracto de *C. scolyms* L. en la ovoalbúmina.

A partir de los resultados observados, las temperaturas óptimas para la hidrólisis de la ovoalbúmina con el extracto de flor de *C. scolyms* L. son 30°C y 36°C para las concentraciones de sustrato del 0,5% y 1%, respectivamente. Esta temperatura óptima de hidrólisis de la ovoalbúmina no coincide con la observada para la caseína bovina al 1%, en la que se producía el máximo de actividad a los 50°C .

Como se ha comentado anteriormente, no se ha encontrado bibliografía sobre hidrólisis de proteína de huevo a partir de cinarasas. En estudios llevados a cabo por Memarpour-Yazdi *et al.* (2012a y 2012b) que utilizaron papaína, sola o en combinación con tripsina, para la hidrólisis de lisozima de la clara de huevo, ésta se produjo a temperatura de 37°C durante dos horas. En el caso de Chen *et al.* (2012a) que utilizaron la papaína para la hidrólisis de clara de huevo la temperatura de proteólisis fue de 50°C durante cinco horas. En los estudios realizados por Eckert *et al.* (2014) sobre yema de huevo y Pokora *et al.* (2014) sobre proteína de clara huevo, se utilizó una serín proteasa vegetal extraída de la pulpa de la *Curcubita ficifolia*. Esta enzima tiene actividad en un amplio rango de temperatura, mostrando actividad enzimática total hasta los 65°C para distintos sustratos. En el caso del huevo, en los estudios mencionados, las condiciones de hidrólisis elegidas fueron: 37°C durante 5 horas, utilizando una concentración de sustrato del 1%. En el estudio de Rawendra *et al.* (2013) utilizaron termolisina a 60°C durante 10 horas para la hidrólisis de clara de huevo de tortuga. En el trabajo llevado a cabo por Nimalaratne *et al.* (2015) se hidrolizó clara de huevo a partir de diversas proteasas procedentes de varias especies de *Aspergillus spp.* y *Bacillus spp.*, utilizando temperaturas en un rango de 45 a 70°C. Por otro lado, en la mayoría de estudios donde se utilizó enzimas de origen animal, como la pepsina, la tripsina y la quimotripsina, para la proteólisis de ovoalbúmina u otras ovoproteínas, la incubación de la reacción de hidrolisis se produjo a 37°C (Miguel *et al.*, 2004; Quirós *et al.*, 2007a; Tanzadehpanah *et al.*, 2013). Esta temperatura está muy próxima al rango estimado como óptimo (30-36°C) en la hidrólisis de la ovoalbúmina con las proteinasas presentes en el extracto de flor de *C. scolymus* L.

IV.3.2. Efecto del pH

La relación entre la absorbancia y el tiempo de incubación para cada una de los pHs estudiados se representa en la Figura IV.18. Asimismo, en la Tabla IV.10 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para los distintos pHs ensayados.

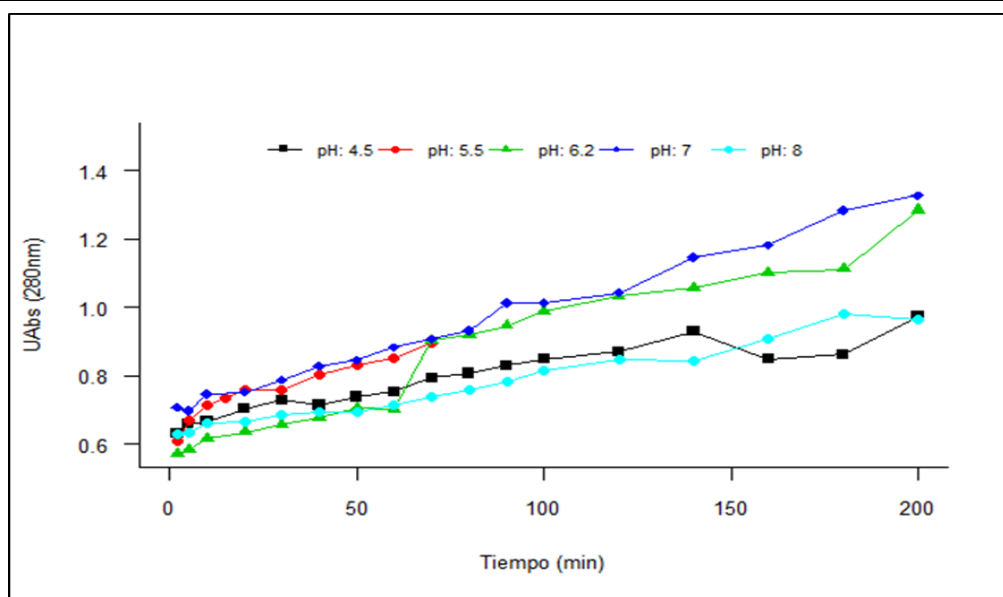


Figura IV. 18. Variación de la absorbancia (relacionada con la actividad proteolítica) con el tiempo de incubación del extracto de alcachofa *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a diferentes pHs.

Tabla IV. 10. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre ovoalbúmina a los distintos pHs ensayados.

pH	Ecuación de la recta	R^2
4,5	$y = 0,6689 + 0,0015x$	88,68%
5,5	$y = 0,6575 + 0,0035x$	91,95%
6,2	$y = 0,5752 + 0,0035x$	94,85%
7	$y = 0,6954 + 0,0032x$	99,34%
8	$y = 0,6241 + 0,0018x$	98,06%

Se estableció un modelo de regresión donde la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina (expresada en $mUAbs \cdot min^{-1}$) en función del pH es igual a: $-20.40 + 7.61pH - 0.61pH^2$ ($R^2=0.9774$), donde el pH varía la velocidad de reacción en 7.61 ± 0.84 ($P=0.0120$), y pH^2 lo hace en -0.61 ± 0.07 ($P=0.0116$), tal y como se muestra en la Figura IV.19.

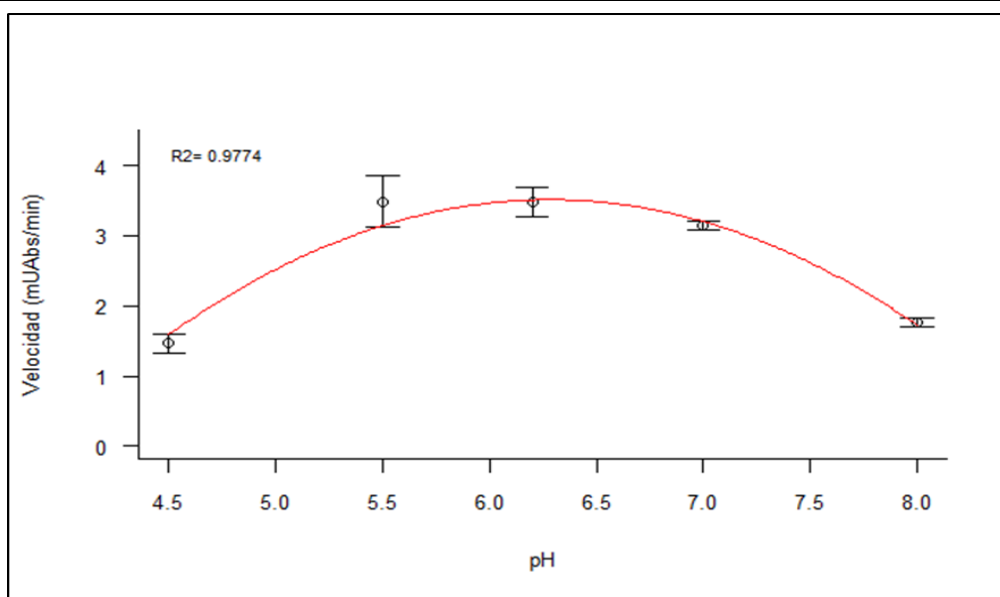


Figura IV. 19. Variación de la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina por el extracto de flor de *C. scolymus* L. en función del pH.

La velocidad de reacción varió de manera significativa con el pH. La acción de la proteólisis del extracto del flor de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina fue mayor en un rango de pH de 5.5 a 6.2 presentando un 91% de la actividad total al pH 7. A los pHs 4.5 y 8, la actividad disminuyó considerablemente a un 43% y 51%, respectivamente. Los resultados obtenidos son similares a los observados para la caseína bovina, donde el rango de pH óptimo de hidrólisis es también 5.5 - 6.2.

Como se ha explicado anteriormente, la acción de las aspartato proteasas se desarrolla a un rango de pH ácido, por lo que los resultados encontrados son similares a los descritos por diversos autores (Chazarra *et al.* 2007, Lorente *et al.*, 2004, Sidrach *et al.* 2005, Silva y Malcata, 2005). En el caso de Chen *et al.* (2012a) que utilizaron la papaína para la hidrólisis de clara de huevo, el pH óptimo de proteólisis fue de 6.0. En la utilización de la papaína, sola o en combinación con tripsina, para la hidrólisis de lisozima de huevo Memarpoor-Yazdi *et al.* (2012a, 2012b) ajustaron el pH a 7.5. Por otro lado, la serín proteasa extraída de la pulpa de *Cucurbita ficifolia* muestra actividad enzimática en un amplio rango de pH: de 6.5 a 11.5. Pokora *et al.*, (2014) utilizó un pH de 8.0 para la hidrólisis de proteína de clara de huevo con esta enzima.

IV.3.3. Efecto de la concentración de proteína del extracto de flor de *C. scolymsus* L.

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de extracto estudiadas se representa en la Figura IV.20. Asimismo, en la Tabla IV.11 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas concentraciones ensayadas.

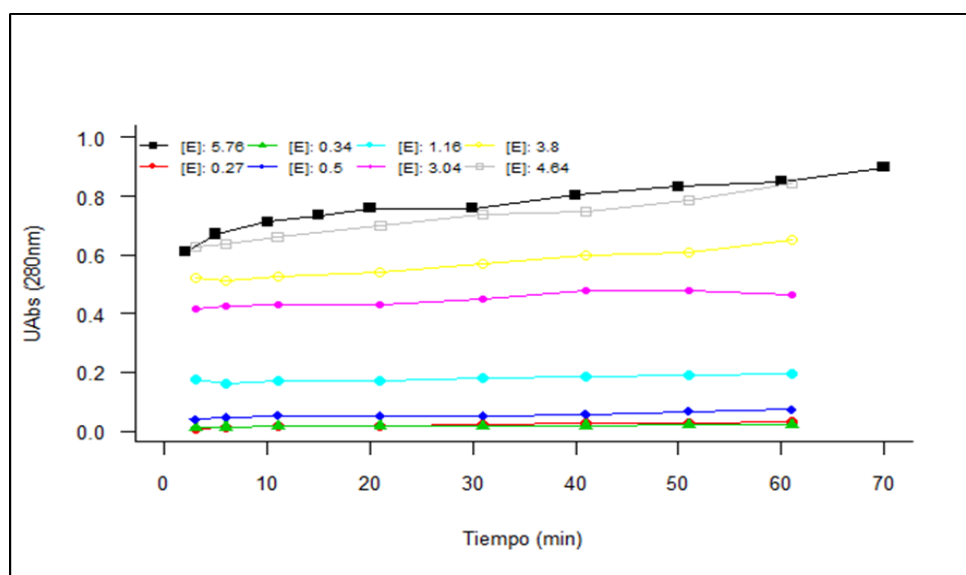


Figura IV. 20. Variación de la absorbancia con el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de proteína del inóculo de extracto de *C. scolymsus* L. (mg/mL) ensayadas.

Se estableció un modelo de regresión para explicar la velocidad de proteólisis (expresada en $\text{mUAbs} \cdot \text{min}^{-1}$) en función de la concentración de proteína del inóculo del extracto enzimático (mg/mL) (E), donde la velocidad es igual a: $-8.56 \cdot 10^{-3} + 0.65E$ ($R^2=0.925$), y dicha concentración enzimática varía la velocidad de reacción en $6.52 \cdot 10^{-1} \pm 7.58 \cdot 10^{-2}$ ($P=1.36 \cdot 10^{-4}$), tal y como se muestra en la Figura IV.21.

Tabla IV. 11. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a distintas concentraciones de proteína del extracto.

Proteína (mg/mL)	Ecuación de la recta	R^2
5,76	$y = 0,6773 + 0,0031x$	96,84%
4,64	$y = 0,6195 + 0,0035x$	98,32%
3,8	$y = 0,5022 + 0,0023x$	97,46%
3,04	$y = 0,412 + 0,0014x$	95,97%
1,16	$y = 0,163 + 0,0005x$	94,85%
0,5	$y = 0,0424 + 0,0005x$	89,04%
0,34	$y = 0,0119 + 0,0002x$	85,50%
0,27	$y = 0,0077 + 0,0004x$	92,65%

Como se puede observar en la representación gráfica, dentro del rango de las concentraciones estudiadas, la variación de la velocidad de la reacción en función de la concentración de extracto sigue una tendencia lineal, produciéndose de manera significativa ($P = 1.36 \cdot 10^{-4}$), un incremento en la actividad proteolítica conforme aumenta la cantidad de enzima.

Con los datos obtenidos, se consideró la concentración de 4,64 mg de proteína/mL de inóculo de extracto de flor de *C. scolymus* L. (es decir, 221 μg de proteína del extracto/mL de solución de ovoalbúmina al 1%) como la óptima para la proteólisis de la ovoalbúmina en las condiciones de ensayo establecidas. Esta concentración es 9,6 veces mayor a la estimada como óptima en el caso de la utilización de caseína bovina como sustrato, lo que podría indicar que las proteasas aspárticas presentes en el extracto de flor de alcachofa tienen una mayor afinidad por la caseína bovina en comparación con la demostrada por la ovoalbúmina.

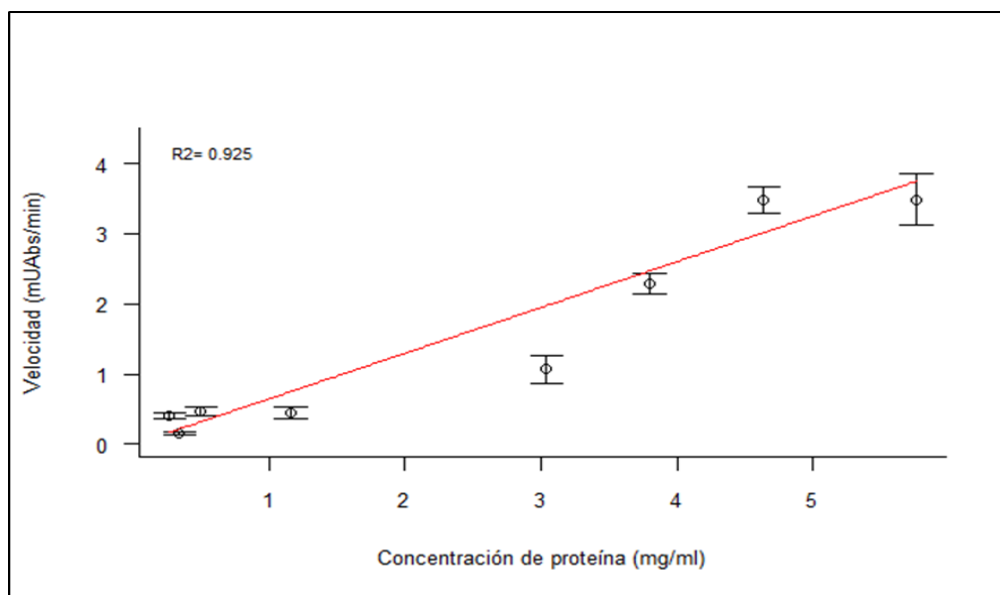


Figura IV. 21. Efecto de la concentración de proteína del extracto de *C. scolymsus* L. en la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina.

IV.3.4. Efecto de la concentración de sustrato. Estimación de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M .

La relación entre la absorbancia y el tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de ovoalbúmina se representa en la Figura IV.22. Asimismo, en la Tabla IV.12 se presentan las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) de la tendencia lineal de la actividad enzimática para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas.

La velocidad de la reacción aumenta a medida que se incrementa la concentración de sustrato hasta estabilizarse a partir de los 12,0 mg de ovoalbúmina/mL, como se puede observar en los valores de los coeficientes de regresión (pendiente de la recta) correspondientes a las diferentes concentraciones de sustrato.

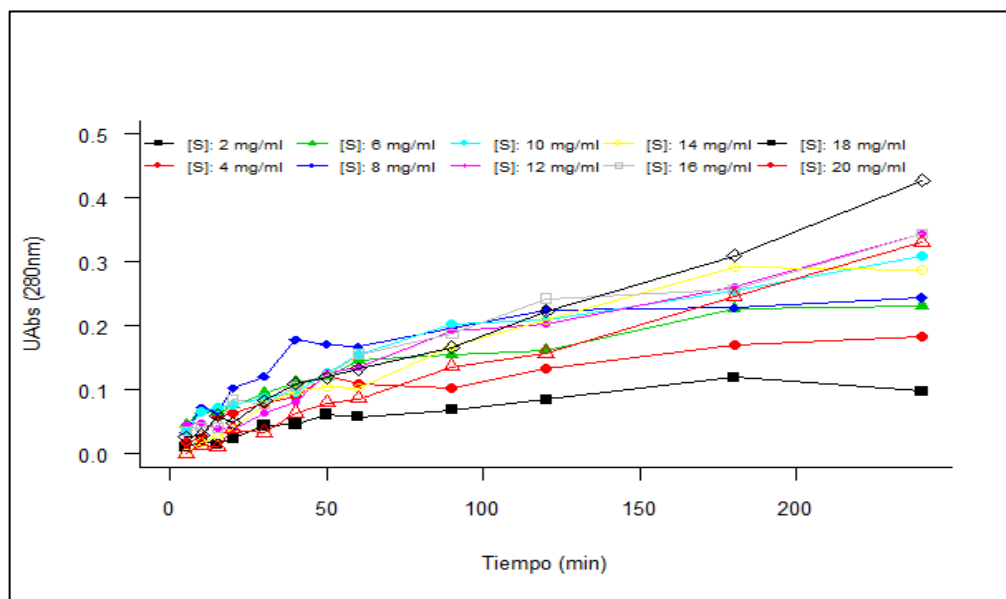


Figura IV. 22. Variación de la absorbancia (correlacionada con la actividad proteolítica) en función del tiempo de reacción para cada una de las concentraciones de ovoalbúmina ensayadas.

Tabla IV. 12. Ecuaciones y coeficientes de determinación (R^2) para la tendencia lineal de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina a distintas concentraciones de sustrato.

Ovoalbúmina (mg/mL)	Ecuación de la recta	R^2
20,00	$y = 0,0008 + 0,0014x$	99,35%
18,00	$y = 0,0267 + 0,0016x$	99,22%
16,00	$y = 0,0464 + 0,0014x$	95,64%
14,00	$y = 0,0251 + 0,0013x$	93,41%
12,00	$y = 0,0365 + 0,0013x$	96,51%
10,00	$y = 0,0604 + 0,0011x$	94,68%
8,00	$y = 0,0928 + 0,0008x$	71,44%
6,00	$y = 0,0644 + 0,0008x$	93,81%
4,00	$y = 0,0511 + 0,0006x$	81,90%
2,00	$y = 0,0240 + 0,0004x$	82,45%

Respecto a la estimación de la velocidad máxima y a la K_M , las cinarasas de la alcachofa presentes en el extracto mostraron un comportamiento michaeliano ($R^2=0.9831$), tal y como se muestra en la Figura IV.23. Este comportamiento fue similar al observado utilizando como sustrato la caseína bovina y a los reportados en cardos silvestres y para la quimosina o renina (Veríssimo *et al.*, 1995; Ramalho-Santos *et al.*, 1996) al igual que el descrito por Sidrach *et al.* (2005) en la cinarasa A purificada utilizando como sustrato un péptido comercial ([H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH]).

El valor de $V_{m\acute{a}x}$ obtenido fue $2.05 \pm 1.5 \cdot 10^{-4}$ mUAbs min^{-1} y el de K_M de 8.63 ± 1.45 mg/mL. Comparando estos parámetros cinéticos con la utilización de caseína bovina como sustrato, el extracto enzimático presentó menor velocidad de hidrólisis (unas cuatro veces inferior) frente a la albúmina de huevo y una K_M mayor (unas 1,5 veces superior), lo que implica que las cinarasas presentes en el extracto de flor de *C. scolymus* L. presentan mayor afinidad por la caseína bovina que por la ovoalbúmina.

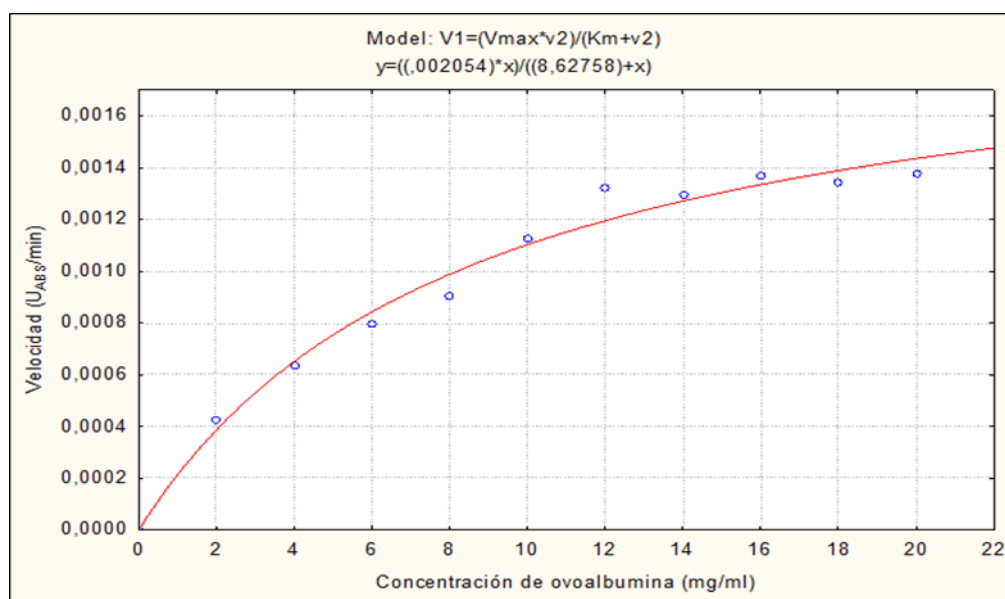


Figura IV. 23. Velocidad de la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. a diferentes concentraciones de sustrato.

IV.3.5. Actividad enzimática durante 24 horas.

La relación entre el producto de la reacción enzimática (correlacionado con la absorbancia) y el tiempo de reacción durante 24 horas se representa en la Figura IV.24. Se estableció un modelo de regresión donde la concentración de péptidos solubles en agua (expresada en UAbs) en función del tiempo en minutos (t), es igual a: $6.28 \cdot 10^{-2} + 8.52 \cdot 10^{-4}t - 2.94 \cdot 10^{-7}t^2$ ($R^2=0.9884$), donde t varía la concentración de producto en $8.52 \cdot 10^{-4} \pm 3.50 \cdot 10^{-5}$ ($P=<2 \cdot 10^{-16}$) y t^2 lo hace en $-2.94 \cdot 10^{-7} \pm 2.16 \cdot 10^{-8}$ ($P=2.60 \cdot 10^{-13}$).

La cantidad de péptidos solubles en TCA, resultado de la hidrólisis de la ovoalbúmina por el extracto de flor de alcachofa, fue en aumento hasta el tiempo de 22,5 horas de incubación (1350 minutos). Para la caseína este tiempo final de reacción, correspondió a las 17 horas de proteólisis. Este comportamiento fue similar al presentado por las cardosinas A y B purificadas de la flor del cardo (*C. cardunculus*) en la hidrólisis de caseína de origen ovino y caprino (Heimgartner *et al.*, 1990).

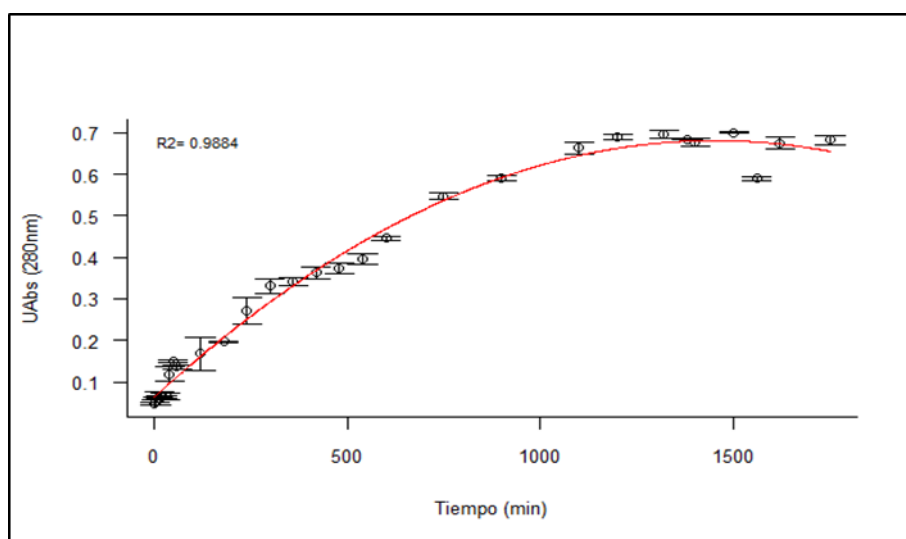


Figura IV. 24. Variación de la concentración de péptidos solubles en agua por la actividad proteolítica del extracto de *C. scolymus* L. sobre la ovoalbúmina en función del tiempo de reacción.

Al igual que ocurría con la caseína, con el tiempo de reacción la velocidad de proteólisis de la ovoalbúmina disminuyó de manera considerable, dada ésta como la diferencia de absorbancia por minuto entre mediciones, tal y como se representa en la Figura IV.25. La velocidad fue máxima los primeros minutos de reacción, disminuyó al 56% a los 55 minutos y al 6,4% a los 420 minutos, cayendo hasta el 1% a los 1350 minutos de incubación.

Cuando se trató de la caseína bovina, la actividad bajó al 1% de su velocidad inicial a los 1020 minutos de tiempo de reacción, 330 minutos antes que en el caso de la ovoalbúmina, sin embargo el descenso de la velocidad de reacción para la caseína bovina con respecto al tiempo fue más paulatino que en el caso de la ovoalbúmina donde la bajada de la velocidad se produjo de una manera más acusada durante los primeros 100 minutos.

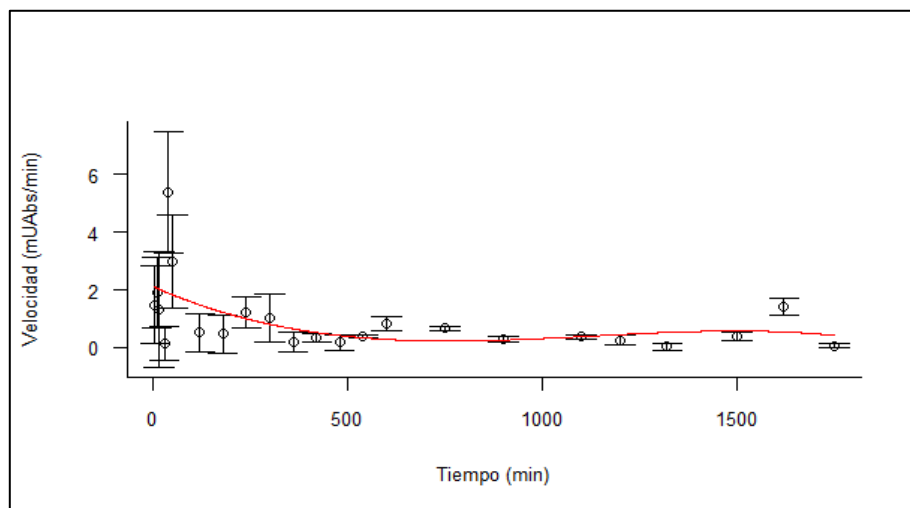


Figura IV. 25. Variación de la velocidad de la actividad proteolítica de la ovoalbúmina del extracto del flor de *C. scolyms* L. con el tiempo de reacción.

IV.4. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE CASEÍNA BOVINA OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L.

Como se ha comentado, se obtuvieron hidrolizados de caseína (HT) a distintos tiempos de hidrólisis: 2, 4 y 16 horas (H2, H4 y H16), y de cada tiempo de hidrólisis, mediante ultrafiltración, se obtuvo su fracción de peso molecular menor de 3kDa (<3kDa).

IV.4.1. Concentración peptídica de los hidrolizados de caseína bovina.

Se ha determinado la concentración de nitrógeno no proteico (NNP) de cada uno de los HTs y sus fracciones <3kDa.

Las concentración en NNP de los hidrolizados de caseína totales y sus fracciones <3kDa se presenta en la Tabla IV.13. El tiempo de hidrólisis afectó de forma significativa al contenido de NNP, tanto en HT como en <3kDa. De esta manera los valores fueron significativamente mayores a las 16 horas ($P \leq 0,05$). No hubo cambios, no obstante, en la concentración de NNP entre los tiempos de hidrólisis de dos y cuatro horas.

Tabla IV. 13. Efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
NNP	HT	3,12 ± 0,45 _a	2,89 ± 0,29 _a	4,28 ± 0,31 _d	≤0,05	≤0,01	>0,05
	<3kDa	1,93 ± 0,30 _{bc}	1,64 ± 0,30 _c	2,24 ± 0,22 _{ab}			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

a, b, c, d. Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Estos resultados coinciden con lo observado por Corrons *et al.* (2017) en hidrolizados de caseína bovina preparados con extracto de *Maclura pomifera*, donde la concentración de péptidos aumentó con el tiempo de hidrólisis, alcanzando, para la fracción <3kDa de su hidrolizado, un valor de 1,8 mg/mL tras tres horas de hidrólisis. Del mismo modo, diversos autores han encontrado

un aumento del grado de hidrólisis de la caseína con el tiempo de hidrólisis en hidrolizados elaborados utilizando enzimas de origen vegetal (Corrons *et al.*, 2017; Di Pierro *et al.*, 2014; Arruda *et al.*, 2012) animal (Petrat-Melin *et al.*, 2016) o microbiano (Chang *et al.* 2013; Jiang *et al.*, 2010).

Como era de esperar, las fracciones <3kDa mostraron una menor concentración en NNP ($P \leq 0,01$) que los HTs a todos los tiempos de hidrólisis.

IV.4.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de caseína bovina.

En la Tabla IV.14 se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis sobre la cantidad de péptidos totales, hidrofóbicos e hidrofílicos, tanto en los hidrolizados totales como en sus fracciones <3kDa. A la hora de la interpretación de los resultados en este apartado hay que tener en consideración que se hace referencia a proporciones de péptidos totales, hidrofílicos e hidrofóbicos, relativas a μg de NNP y no cantidad absoluta en el hidrolizado o en su fracción <3kDa.

Tabla IV. 14. Efecto del tiempo de hidrólisis en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de caseína bovina, expresada en área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
Total/ μg	HT	142,65 $\cdot 10^4 \pm 1,3 \cdot 10^4$ _{cd}	180,95 $\cdot 10^4 \pm 11,2 \cdot 10^4$ _{de}	195,75 $\cdot 10^4 \pm 8,2 \cdot 10^4$ _e	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$> 0,05$
	<3kDa	79,07 $\cdot 10^4 \pm 7,4 \cdot 10^4$ _a	99,07 $\cdot 10^4 \pm 7,1 \cdot 10^4$ _{ab}	130,05 $\cdot 10^4 \pm 8,6 \cdot 10^4$ _{bc}			
HI/ μg	HT	8,78 $\cdot 10^4 \pm 3,0 \cdot 10^4$ _a	6,19 $\cdot 10^4 \pm 0,7 \cdot 10^4$ _a	18,52 $\cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4$ _c	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$> 0,05$
	<3kDa	8,41 $\cdot 10^4 \pm 2,3 \cdot 10^4$ _a	10,02 $\cdot 10^4 \pm 0,4 \cdot 10^4$ _b	26,91 $\cdot 10^4 \pm 0,9 \cdot 10^4$ _d			
HO/ μg	HT	133,86 $\cdot 10^4 \pm 2,2 \cdot 10^4$ _b	174,76 $\cdot 10^4 \pm 10,6 \cdot 10^4$ _c	177,23 $\cdot 10^4 \pm 9,1 \cdot 10^4$ _c	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$> 0,05$
	<3kDa	70,66 $\cdot 10^4 \pm 25,5 \cdot 10^4$ _a	89,05 $\cdot 10^4 \pm 7,0 \cdot 10^4$ _a	103,14 $\cdot 10^4 \pm 9,2 \cdot 10^4$ _{bc}			
HO/HI	HT	18,54 $\pm 4,87$ _c	28,63 $\pm 1,97$ _d	10,40 $\pm 2,48$ _b	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,059
	<3kDa	8,55 $\pm 2,11$ _b	8,90 $\pm 0,71$ _b	3,86 $\pm 0,42$ _a			

Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

a, b, c, d, e: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

El área total de los hidrolizados incrementó de manera significativa ($P \leq 0,01$) con el tiempo de hidrólisis tanto en el HT como en la fracción $<3\text{kDa}$. Hubo un incremento significativo en el hidrolizado de 16 horas respecto al de dos horas ($P \leq 0,05$), no produciéndose una gran diferencia ($P > 0,05$) con el tiempo de hidrólisis de cuatro horas. Lo mismo ocurrió si nos referimos a sus fracciones $<3\text{kDa}$. Estos resultados son similares a los encontrados por Corrons *et al.* (2017), donde la intensidad de los picos de los hidrolizados aumentó considerablemente con el tiempo de hidrólisis de la caseína bovina a partir de un extracto de látex de *Maclura pomifera*. También Otte *et al.* (2007b) halló un incremento en la concentración de péptidos con el tiempo de hidrólisis en los perfiles de electroforesis de hidrolizados de caseínmacropéptido a partir de diferentes enzimas: tripsina, pepsina, termolisina, proteinasa K y proteasa de *Bacillus licheniformis*, sin embargo en este mismo trabajo no se hallaron diferencias después de las tres horas de hidrólisis en los perfiles de electroforesis de los péptidos de hidrolizados de caseinato y β -caseína. Tampoco se observaron diferencias a distintos tiempos de hidrólisis (1-240 minutos) entre los perfiles RP-UPLC de los hidrolizados de caseína bovina elaborados con una proteinasa extraída del látex de la higuera (*Ficus carica*) (Di Pierro *et al.*, 2014). Los hidrolizados totales presentaron mayor concentración de péptidos por μg de NNP que sus fracciones $<3\text{kDa}$ en todos los casos ($P \leq 0,01$).

Los péptidos hidrofílicos aumentaron significativamente ($P \leq 0,05$) con el tiempo de hidrólisis tanto en el HT como en la fracción $<3\text{kDa}$. En ambos casos, el principal incremento se produjo de las 4 a las 16 horas, estableciéndose diferencias significativas ($P \leq 0,05$). De la misma manera, Corrons *et al.* (2017) y De Gobba *et al.* (2014b) encontraron que a mayor tiempo de hidrólisis, los péptidos resultantes aparecían a menores tiempos de elución demostrando ser más hidrofílicos. En nuestro caso, el tamaño de los péptidos también afectó de manera significativa ($P \leq 0,05$) en la cantidad de péptidos hidrofílicos. Así, a partir de las 4 horas de hidrólisis se observaron valores significativamente ($P < 0,05$) más elevados en la fracción $<3\text{kDa}$ que en HT. Esto puede ser debido a que el peso molecular de los péptidos influye en su tiempo de elución (De Gobba *et al.*, 2014b).

Los péptidos hidrófobos aumentaron de manera significativa con el tiempo de hidrólisis ($P \leq 0,05$). En el caso de los HTs los péptidos hidrófobos aumentaron

de dos a cuatro horas de hidrólisis ($P \leq 0,05$), no produciéndose apenas incremento de las cuatro a las 16 horas. Si atendemos a sus fracciones $<3\text{kDa}$, la correspondiente al hidrolizado de 16 horas fue la más rica en péptidos hidrofóbicos. Por otro lado, los hidrolizados totales presentaron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos por μg de NNP respecto a sus fracciones $<3\text{kDa}$ ($P \leq 0,01$), excepto en el caso del H16 donde la diferencia no fue significativa ($P > 0,05$). La menor concentración en péptidos hidrofílicos de las fracciones $<3\text{kDa}$ puede ser debido a que los péptidos de menor peso molecular aparecen a menor tiempo de elución considerándose hidrofílicos (De Gobba, *et al.* 2014b). Por otro lado, Cheng *et al.* (2013) no encontró diferencias entre la hidrofobicidad de superficie de hidrolizados de κ -caseína con tripsina y sus fracciones, sin embargo Hidalgo *et al.* (2005) observaron que la hidrofobicidad de superficie disminuía con el tiempo de hidrólisis.

La relación entre los péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos, (HO/HI) se vió afectada por el tiempo de hidrólisis de manera significativa ($P \leq 0,01$). Así, el hidrolizado de cuatro horas, tanto en su totalidad como en la fracción $<3\text{kDa}$, fue el que mayor ratio presentó, disminuyendo considerablemente a las 16 horas de hidrólisis por contener mayor concentración de péptidos hidrofílicos. No se han encontrado estudios en la bibliografía sobre la evolución del ratio de péptidos HO/HI en hidrolizados. En quesos de leche de oveja elaborados con cardo como el ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos, no siguió una tendencia clara durante el período de maduración; presentando un mayor ratio a los 30 días (1.44) que a los 7 días de maduración (0.61), para volver a disminuir el día 60 (0.82) y al día 90 (0.64) (Agboola *et al.*, 2004). Algo parecido sucedió en el queso de Murcia al Vino elaborado con cardo donde, durante los 60 días de maduración aumentaron tanto los péptidos hidrofílicos como los hidrofóbicos, pero en el caso del ratio de HO/HI no se observó una tendencia (Tejada *et al.*, 2008). En el trabajo realizado por González de Llano *et al.* en 1994, donde se estudió el perfil de proteólisis de diferentes quesos asturianos artesanos y comerciales, se observó también que durante el tiempo de maduración la cantidad de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos aumentaba; sin embargo, la tendencia del ratio de hidrofobos e hidrófilos siguió en este caso una línea descendente, disminuyendo con los días de maduración.

Por otra parte, en nuestro caso los hidrolizados totales presentaron mayor ratio de péptidos HO/HI, ($P \leq 0,01$), siendo menor en las fracciones $<3\text{kDa}$. Esto puede ser debido a que el tamaño y el peso molecular condicionan el tiempo de elución, siendo los péptidos más pequeños los que eluyen antes, y por lo tanto, la fracciones $<3\text{kDa}$ presentan mayor proporción de péptidos hidrofílicos que sus HTs. No se han encontrado en la bibliografía estudios comparando el ratio de HO/HI entre hidrolizados y/ó sus fracciones de menor peso molecular.

La cantidad total de péptidos en los hidrolizados es una característica a tener en cuenta, ya que la bioactividad de los mismos (antioxidante, IECA-I, antimicrobiana, etc.) es dependiente de su concentración (Ibrahim *et al.*, 2017; Arruda *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2011). Por otra parte, la concentración de péptidos hidrofóbicos y el ratio HO/HI en los hidrolizados son factores importantes en cuanto a la bioactividad potencial de los mismos, ya que se ha visto que la composición en aminoácidos hidrofóbicos tiene un efecto significativo en la captación de radicales libres, por lo tanto los péptidos con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos podrían tener mayor actividad antioxidante (Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Respecto a la actividad IECA, Cheung *et al.* (1980) indicó que la ECA tiene mayor querencia por sustratos o inhibidores competitivos que contengan residuos aminoácidos hidrofóbicos como la Pro, Phe y Tyr en el C-terminal. Por otra parte, además de presentar carga catiónica, uno de los principales factores que otorgan actividad antimicrobiana a los péptidos es la alta proporción de residuos hidrofóbicos (Nguyen *et al.*, 2011).

Si nos fijamos en las imágenes de los perfiles cromatográficos de los hidrolizados a los distintos tiempo de hidrólisis (Figura IV.26), aunque la intensidad de los picos principales se ve incrementada con el tiempo de hidrólisis, en general el conjunto del perfil cromatográfico es similar entre los diferentes hidrolizados.

Este perfil constante en los picos durante el tiempo de hidrólisis podría indicar que las proteasas presentes en el extracto de *C. scolymus* L. poseen cierta especificidad de anclaje en los enlaces peptídicos, de forma similar a lo descrito en Corrons *et al.* (2017) para las proteasas obtenidas de un extracto de látex de *Maclura pomifera*. Los picos de los cromatogramas de las fracciones $<3\text{kDa}$, debido al bajo peso molecular y al tratarse de los filtrados de HT, presentan menor intensidad en todos los casos que sus HTs.

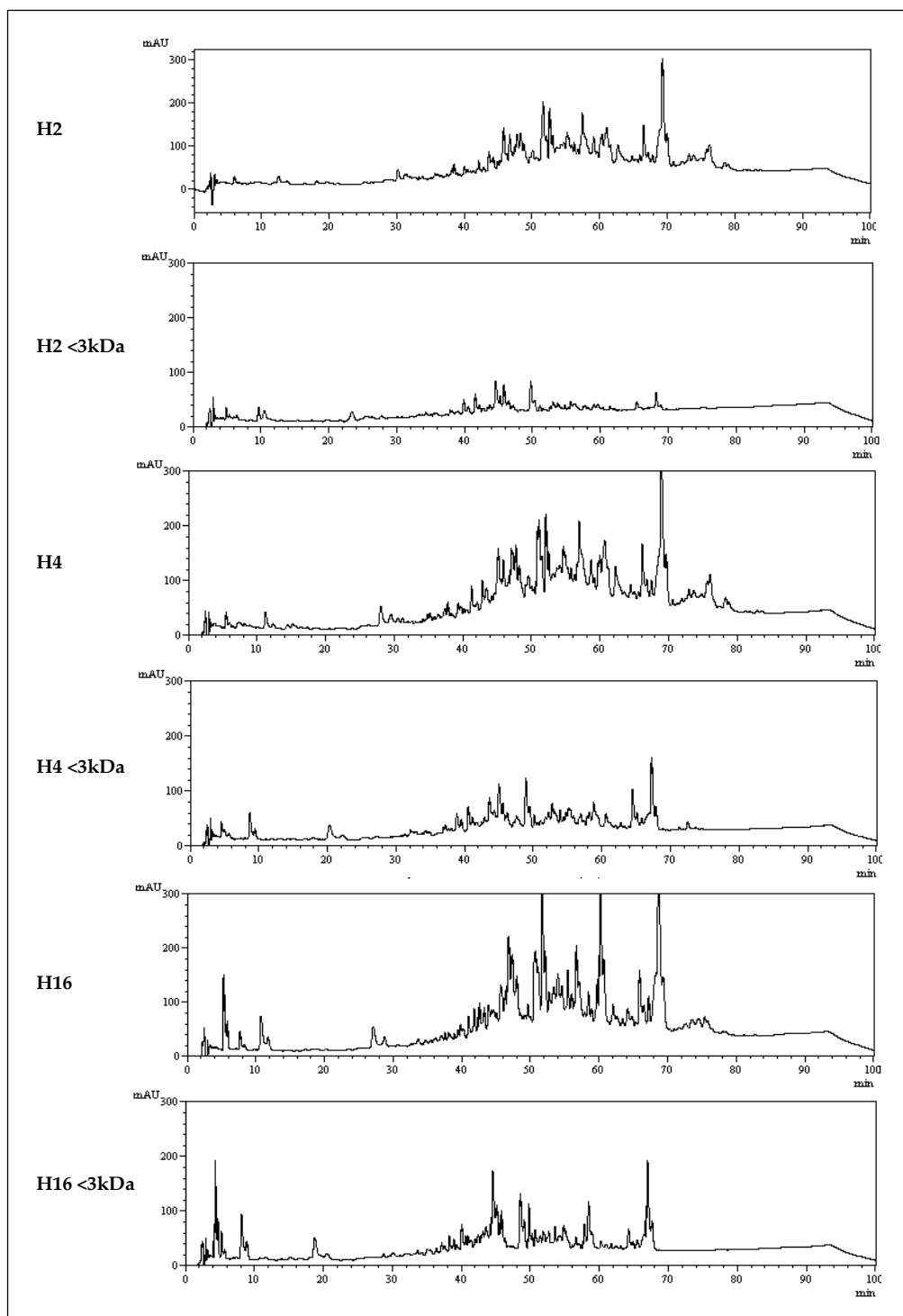


Figura IV. 26. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína bovina obtenidos a partir de un extracto de flor de *C. scolyms L.*

IV.4.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína bovina.

En la Tabla IV.15 y la Figura IV.27, se muestran los porcentajes de actividad IECA de los HTs de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolyms* L. a distintos tiempos de hidrólisis, así como de sus fracciones <3kDa.

El tiempo de hidrólisis y el peso molecular de los péptidos influyó de manera significativa ($P \leq 0,01$) en la actividad IECA de los hidrolizados.

La inhibición de la ECA varió con el tiempo de hidrólisis ($P \leq 0,01$), siendo el hidrolizado de 16 horas el más potente. El hidrolizado de 16 horas fue el que aportó péptidos con mayor actividad IECA-I, tanto en HT como en <3kDa. Si atendemos a los hidrolizados totales de dos y cuatro horas de hidrólisis, no hubo diferencias en la actividad IECA-I entre ellos (22,63 % y 26,15%, respectivamente). Si comparamos la actividad IECA-I de las fracción <3kDa a los distintos tiempos de hidrólisis, no existen diferencias entre ellos en cuanto a actividad IECA-I se refiere (H2: 65,88%, H4: 66,86% y H16: 61,91%).

Tabla IV. 15. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA de los hidrolizados de caseína a la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
% IECA	HT	22,63 \pm 6,41 _a	26,15 \pm 0,92 _a	55,05 \pm 3,69 _b	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
	<3kDa	65,88 \pm 0,68 _c	66,86 \pm 0,57 _c	61,91 \pm 3,22 _{bc}			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

_{a, b, c}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

En diversas publicaciones se ha demostrado que el tiempo de hidrólisis influye en la actividad IECA de los hidrolizados de caseína (Corrons *et al.*, 2017, De Gobba *et al.* 2014b, Jiang *et al.*, 2010, Mao *et al.*, 2007, Welderufael *et al.*, 2012), aumentando la inhibición de la ECA con el tiempo de proteólisis de los hidrolizados, hasta alcanzarse un determinado grado de hidrólisis por encima del cual podrían originarse fragmentos de péptidos menos activos (Welderufael *et al.*, 2012). En este sentido, Jiang *et al.* en 2010 describieron que la actividad IECA de

los hidrolizados de caseína con la proteasa neutra AS1.398, procedente de *Bacillus subtilis*, aumentaba con el tiempo de hidrólisis hasta las 12 horas, disminuyendo la actividad cuando el tiempo se alargaba a 24 horas de proteólisis. Igualmente, Mao *et al.* (2007) estudiaron la actividad IECA de hidrolizados de caseína de leche de yak con alcalasa a diferentes tiempos del hidrólisis hasta los 360 minutos, presentándose un incremento en la actividad durante los primeros 240 minutos, disminuyendo ésta en los tiempos de hidrólisis de 300 y 360 minutos. No obstante, y en contraposición con lo observado en nuestros resultados, Otte *et al.* (2007b) no encontraron diferencias significativas en la actividad IECA entre 3 y 24 horas de hidrólisis en distintos hidrolizados de caseína obtenidos a partir de enzimas digestivas y de origen microbiano.

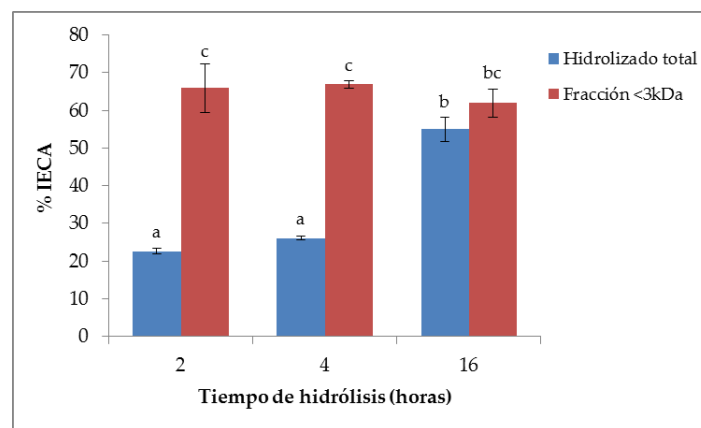


Figura IV. 27. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Por otra parte, el tamaño molecular de los péptidos influyó de manera significativa y muy evidente en la actividad IECA-I ($P \leq 0,01$), siendo las fracciones <3kDa de los hidrolizados las que mostraron mayor porcentaje de inhibición en todos los casos, aunque no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad IECA del HT de 16 horas (55,05%) y su fracción <3kDa (61,91%). La mayor actividad IECA de los péptidos pequeños, puede ser debida a que por su menor tamaño podrían tener mejor accesibilidad para unirse

al sitio activo de la ECA (Natesh *et al.*, 2003). Estos resultados coinciden con lo observado en otros trabajos con hidrolizados de caseína (Corrons *et al.* 2017; De Gobba *et al.*, 2014b; Jiang *et al.*, 2010; Miguel *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2007).

Nuestro hidrolizado de caseína de 16 horas tuvo una IC₅₀ de 114,21 µg/mL, y su fracción <3kDa de 87,86 µg/mL. Estos valores son más bajos (indicando mayor actividad) que los encontrados en varios estudios similares al nuestro descritos a continuación. Así, en la hidrólisis de caseína bovina a partir de un extracto de látex de *Maclura pomifera*, Corrons *et al.* (2017) describieron un valor de IC₅₀ de 1'72 mg/mL para la fracción <3kDa del hidrolizado. Wu *et al.* (2013a) hicieron hidrolizados de caseína mediante hidrólisis con una proteasa de envoltura de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (ATCC15088), obteniendo una fracción de α-caseína entre 5 y 10 kDa que mostró una IC₅₀ de 2,36 mg/mL, y otra fracción correspondiente a β- caseína que rindió una IC₅₀ de 4 mg/mL. Walderufael *et al.* (2012) obtuvieron un hidrolizado compuesto principalmente de péptidos derivados de la caseína mediante una serie de procesos de adsorción, hidrólisis con la proteasa N "Amano" (EC: 3.4.24.28) de *Bacillus subtilis* y microfiltración, a partir de proteínas del suero; dicho hidrolizado dio un valor de IC₅₀ para la actividad IECA de 285 µg/ml. Mao *et al.* (2007) obtuvieron hidrolizados de caseína de yak con alcalasa, consiguiendo una actividad IECA de un 79,5%, y de un 85,4% para su ultrafiltrado menor de 6kDa, a una concentración final en el ensayo de 4mg/mL, siendo esta concentración de hidrolizado muy superior a la utilizada en nuestro caso (0,125 mg/mL), por lo podemos afirmar que nuestros hidrolizados rindieron mayor actividad IECA. Por otra parte, en este mismo estudio (Mao *et al.*, 2007), se purificaron dos péptidos del hidrolizado que mostraron actividad IECA: PPEIN y PLPLL, con un valor de IC₅₀ de 290µg/mL y de 250µg/mL, respectivamente, siendo ambos péptidos menos potentes que los hidrolizados de 16 horas obtenidos a partir de caseína bovina con *C. scolymsus* L.. Wu *et al.* (2013b) aislaron una fracción de hidrolizado pancreático de caseína con un 73,5% de actividad IECA a una concentración de muestra de 1mg/mL, siendo esta concentración ocho veces superior a la utilizada en nuestros ensayos. Jiang *et al.* (2010) obtuvieron una IC₅₀ de 684µg/mL para el hidrolizado de caseína bovina con proteasa neutra AS1.398, y el valor de 461µg/mL para su fracción <3kDa. Por otro lado, en el estudio llevado a cabo por Otte *et al.* (2007), se utilizaron nueve proteínas lácteas como sustrato de la hidrólisis *in vitro* con cinco proteasas

distintas: tripsina, pepsina, proteinasa K, termolisina y proteasa de *Bacillus licheniformis*. Otte *et al.* (2007b) declararon que la caseína como sustrato dio hidrolizados con mayor actividad IECA que los obtenidos con proteínas del suero (85% vs. 79%), y que la termolisina fue la enzima que rindió péptidos con mayor inhibición de la ECA con valores de IC₅₀ entre 95-447 µg/mL. Este rango de concentración es comparable al resultado obtenido para el hidrolizado de 16 horas obtenido con extracto de flor de *C. scolymus* que presentó una IC₅₀ de 114,21 µg/mL.

Por otra parte, varios trabajos refirieron mayor actividad IECA de hidrolizados de caseína que la documentada en nuestro estudio. De Gobba *et al.* (2014b) describieron un valor de IC₅₀ de 62 µg/mL para el hidrolizado de caseína de 24 horas, utilizando un sobrenadante del cultivo de *Arsukibacterium ikkense* como fuente de proteasas. Ibrahim *et al.* (2017) obtuvieron hidrolizados de caseína caprina con pepsina a tiempo de dos horas, con un 80% de actividad IECA a una concentración de ensayo de 10 µg/mL. Miguel *et al.* (2009) obtuvieron hidrolizados de caseína bovina a partir de pepsina porcina con un valor de IC₅₀ de 52,8 µg/mL y de 5,5 µg/mL para su fracción <3kDa. De la misma manera, López-Expósito *et al.* (2007) documentaron la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de α₂-caseína y κ-caseína con pepsina con un valor de IC₅₀ de 41,8 y 9,97 µg proteína/mL, respectivamente.

Podemos afirmar que los hidrolizados de caseína obtenidos mediante la acción del extracto de flor de *C. scolymus* L., presentaron una potente actividad IECA-I *in vitro*. Esto puede ser debido a que las proteinasas aspárticas de flores de varias especies del género *Cynara*, tienen una elevada acción proteolítica que conduce a una fragmentación intensa de las caseínas (Galán *et al.*, 2008), produciéndose péptidos pequeños. Además se ha evidenciado que el uso de estas enzimas como coagulantes vegetales en la elaboración de quesos, da lugar a la formación de mayor cantidad de péptidos hidrofóbicos en comparación con el uso de enzimas de origen animal o microbiano (Agboola *et al.*, 2004; Carrera *et al.*, 1999; Tejada *et al.*, 2008), siendo estos péptidos con residuos hidrofóbicos los que han demostrado mayor actividad IECA (Cheung *et al.*, 1980).

IV.4.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe²⁺ de los hidrolizados de caseína bovina.

En la Tabla IV.16 y la Figura IV.28, se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de caseína bovina obtenidos a partir de un extracto de *C. scolymus* L.

Respecto al tiempo de hidrólisis de las muestras y considerando el conjunto de los resultados, podemos decir que no influyó de manera significativa en la actividad captadora del radical (RSA) DPPH de los hidrolizados ($P > 0,05$), aunque H4 como hidrolizado total presentó mayor TEAC (5,55 μ M Trolox/mg) que H2 y H16 (4,41 y 4,35 μ M Trolox/mg, respectivamente).

Tabla IV. 16. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
% RSA	HT	27,42 \pm 3,18 _a	24,87 \pm 2,71 _b	30,89 \pm 5,47 _a	>0,05	\leq 0,05	>0,05
	<3kDa	22,30 \pm 2,71 _b	14,44 \pm 1,97 _c	25,67 \pm 4,82 _{ab}			
Eq μ M Trolox/mg	HT	4,41 \pm 0,51 _a	5,55 \pm 0,61 _b	4,35 \pm 0,72 _a	>0,05	\leq 0,05	>0,05
	<3kDa	6,04 \pm 0,76 _b	6,18 \pm 0,85 _b	6,27 \pm 1,06 _b			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

^{a, b, c}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Precisamente, el hidrolizado de cuatro horas fue el que presentó mayor ratio HO/HI y mayor concentración de péptidos hidrofóbicos. En relación con nuestros resultados, Kumar *et al.* (2016a) describieron un aumento de la captación del radical DPPH con el tiempo de hidrólisis hasta las 6 horas en hidrolizados de caseína de leche de camello con α -quimotripsina, alcalasa y papaína, con una actividad del 37,65%, 32,25% y 28,38%, respectivamente. Estos porcentajes de hidrólisis son comparables a los obtenidos con nuestros hidrolizados de caseína bovina preparados con extracto de flor de alcachofa. En el estudio llevado a cabo por Mao *et al.* (2011) hubo un aumento de la captación del DPPH con el tiempo de hidrólisis hasta las 7 horas. Cuando se superó este tiempo de reacción de

proteólisis, la actividad captadora de radicales de los hidrolizados disminuyó. Su hidrolizado de cuatro horas alcanzó una RSA frente al DPPH del 60%.

Por otra parte, el peso molecular de los hidrolizados de caseína con *C. scolyimus* L. influyó de manera significativa ($P \leq 0,05$) sobre la captación del radical DPPH. Si atendemos al porcentaje de captación del radical, los hidrolizados totales mostraron mayor actividad que sus fracciones de tamaño molecular $<3\text{kDa}$ ($P \leq 0,05$), de forma similar a lo referido por Kumar *et al.* (2016b). Esto es debido a la mayor concentración en péptidos del hidrolizado total respecto a su filtrado, ya que si atendemos a su capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) por mg de péptidos del hidrolizado, fueron los péptidos de menor peso molecular los que demostraron tener mayor actividad en comparación con los hidrolizados totales ($P \leq 0,05$). Este resultado concuerda con lo descrito por Mao *et al.* (2011) donde se vio una relación dosis-dependiente en la actividad de captación de radicales libres DPPH de los hidrolizados de caseína de yak preparados con alcalasa. Por otra parte, Chang *et al.* (2013) no obtuvieron actividad frente al radical DPPH en sus hidrolizados de caseína obtenidos mediante fermentación con *Bifidobacterium longum* KACC91563.

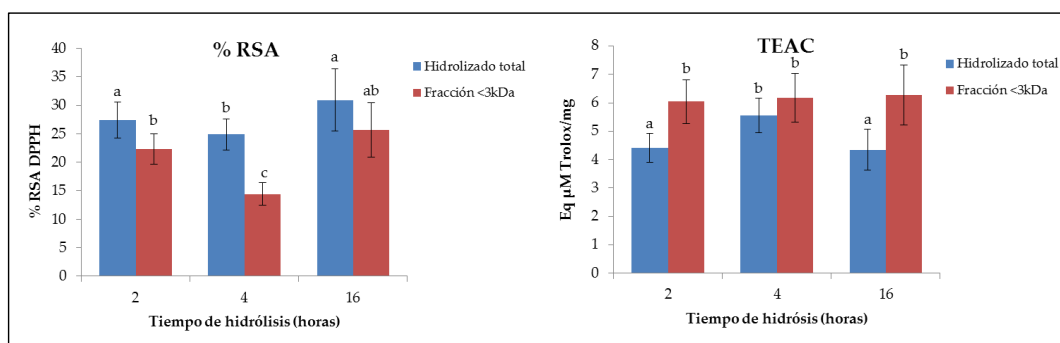


Figura IV. 28. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad antioxidante frente al DPPH, expresado en porcentaje y TEAC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En la Tabla IV.17 y Figura IV.29, se muestran el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular de los hidrolizados en la acción captadora del radical de ABTS.

El tiempo de hidrólisis y el peso molecular de los péptidos influyeron significativamente ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$, respectivamente) en la captación del radical ABTS•⁺.

Tabla IV. 17. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS•⁺ de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
RSA IC ₅₀ (µg/mL)	HT	9,00 ± 0,22 _{bc}	8,00 ± 0,26 _d	6,65 ± 0,55 _e	≤0,01	≤0,05	≤0,01
	<3kDa	10,52 ± 0,66 _a	9,59 ± 0,63 _{abc}	4,61 ± 0,10 _f			
Eq mM Trolox·mg ⁻¹	HT	3,18 ± 0,08 _{ab}	3,58 ± 0,11 _{bc}	4,36 ± 0,34 _c	≤0,01	≤0,01	≤0,01
	<3kDa	2,74 ± 0,16 _a	3,01 ± 0,21 _{ab}	6,21 ± 0,13 _d			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

a,b,c,d,e,f: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Se observó que el tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa en la actividad antioxidante frente al radical ABTS ($P \leq 0,01$), produciéndose una disminución de la IC₅₀ y a la vez, un incremento del TEAC (indicando mayor potencia antioxidante). Así, H16 y su fracción <3kDa fue el hidrolizado con mayor capacidad antioxidante frente al radical ABTS, presentando una IC₅₀ de 6,65 y 4,61 µg/mL, respectivamente. Estos resultados obtenidos guardan concordancia con lo descrito en diversos estudios, donde el tiempo de hidrólisis afectó a la capacidad de captación del radical ABTS de los hidrolizados, incrementando por lo general su acción antioxidante (Kumar *et al.*, 2010, 2016a; Petrat-Melin *et al.*, 2016; De Gobba *et al.*, 2014a; Chang *et al.*, 2013; Gómez-Ruiz *et al.*, 2008).

Por otra parte, el tamaño molecular afectó de manera significativa a la captación del radical de ABTS por parte de los hidrolizados ($P \leq 0,05$). Así, en el caso de H2 y H4 las fracciones <3kDa demostraron menor actividad respecto a sus hidrolizados totales ($P \leq 0,05$). Sin embargo, el ultrafiltrado de H16 mostró una acción antioxidante más potente que su total ($P \leq 0,05$). De igual manera, otros autores indicaron que el peso molecular también influyó en su actividad, siendo las fracciones de menor peso molecular (<3kDa y <1kDa) las más potentes (Shanmugan *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2013).

El valor IC_{50} de H16 ($6,65 \mu\text{g}/\text{mL}$) es del mismo orden al referido por De Gobba *et al.* (2014b), $5 \mu\text{g}/\text{mL}$, para el hidrolizado de caseína con enzimas de *A. ikkense* de 24 horas. Por otra parte, el hidrolizado de caseína bovina obtenido por la acción de proteasas de *C. scolymus* L. H16 mostró un valor de IC_{50} unas 50 veces más bajo (indicando mayor actividad) que el demostrado por Kitts (2005) en un hidrolizado de caseína bovina con tripsina ($\approx 350 \mu\text{g}/\text{mL}$), y mucho menor que el hidrolizado utilizando *Flavorzyme*[®] ($IC_{50} \approx 2 \text{mg}/\text{mL}$) (Rossini *et al.*, 2009). Por otro lado, Li *et al.* (2013) describió un valor IC_{50} para el hidrolizado de caseína de cabra, preparado mediante una combinación de proteasas neutras y alcalinas, de $0,45 \mu\text{g}/\text{mL}$, siendo esta concentración unas 15 veces menor que la obtenida para nuestro hidrolizado de 16 horas.

Si atendemos al TEAC podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos en el estudio llevado a cabo por Petrat-Melin *et al.* (2016) donde se practicó la digestión gastrointestinal *in vitro* de las variantes purificadas A, B y C de la κ -caseína bovina y se indica una media de equivalencia al Trolox de $0,53 \mu\text{mol Trolox}/\text{mg}$ tras tres horas de digestión. En nuestro caso, el hidrolizado de dos horas dio una equivalencia de $0,80 \mu\text{mol Trolox}/\text{mg}$, el de cuatro horas de $0,90 \mu\text{mol Trolox}/\text{mg}$ y el de 16 horas de $1,09 \mu\text{mol Trolox}/\text{mg}$, demostrando mayor actividad que las variantes purificadas de la κ -caseína analizadas.

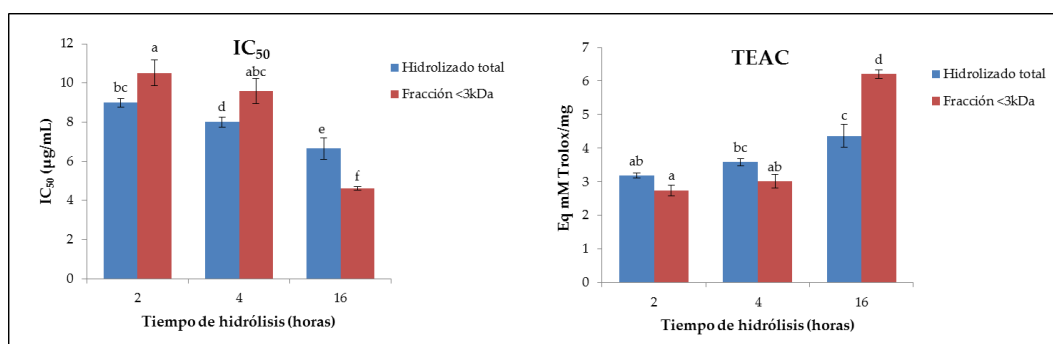


Figura IV. 29. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del $ABTS^{\bullet+}$ de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En la Tabla IV.18 y Figura IV.30 se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymsus* L.y sus ultrafiltrados.

En cuanto a la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína, tanto el tiempo de hidrólisis como el peso molecular de los hidrolizados afectaron de manera significativa ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$, respectivamente) en dicha actividad.

Tabla IV. 18. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
AQ Fe²⁺	HT	222,30 ± 12,30 _{ab}	188,33 ± 6,91 _a	337,09 ± 4,89 _c	≤0,01	≤0,05	≤0,01
IC₅₀ (µg/mL)	<3kDa	360,71 ± 3,78 _c	249,52 ± 21,66 _b	221,49 ± 18,29 _b			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

^{a, b, c}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Respecto al efecto del tiempo de hidrólisis, si atendemos a los hidrolizados totales y analizamos su evolución, ésta no siguió una tendencia clara, no existiendo diferencias considerables entre H2 y H4, disminuyendo la acción quelante entre las cuatro horas y las 16 horas de hidrólisis de manera significativa ($P \leq 0,05$). Para las fracciones <3kDa, la actividad quelante se incrementó con el tiempo de hidrólisis de manera significativa ($P \leq 0,05$) de dos a cuatro horas de hidrólisis aunque no se observó un aumento considerable ($P \leq 0,05$) entre las cuatro y las 16 horas de proteólisis. En este sentido, Hidalgo *et al.* (2015) describió que la actividad quelante de los hidrolizados de caseinato sódico bovino preparados a partir de proteasas obtenidas de *Bacillus* sp., aumentaba con el tiempo de hidrólisis hasta las 3 horas. Por otra parte, Corrêa *et al.* (2011) y Hogan *et al.* (2009) describieron que la actividad quelante de sus hidrolizados disminuyó con el tiempo de hidrólisis.

En cuanto al efecto del peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados, éste fue significativo ($P \leq 0,05$), presentado las fracciones <3kDa de H2 y H4 menor actividad que sus HTs ($P \leq 0,05$), y siendo las fracción

<3kDa de H16 más potente que su HT ($P \leq 0,05$). La mayor actividad del HT en el caso de H2 y H4 podría deberse a la diversidad en el tamaño molecular y secuencias, así como en la estructura funcional de los péptidos constituyentes del hidrolizado que podrían tener un efecto sinérgico en la actividad quelante (Kumar *et al.*, 2016b). Por otra parte, Hogan *et al.* (2009) no encontró diferencias en la actividad quelante del hierro (II) entre los distintos pesos moleculares de los hidrolizados.

Si consideramos el valor de IC_{50} , podemos decir que el hidrolizado total de cuatro horas fue el que mostró mayor actividad quelante del hierro (II): 188,30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Precisamente este hidrolizado fue el que presentó un mayor ratio HO/HI y mayor concentración de péptidos hidrofóbicos, habiéndose descrito que la presencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos en los péptidos puede contribuir a una mayor actividad quelante (Pownall *et al.*, 2010). Li *et al.* (2013) reportó una IC_{50} de 48,184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el hidrolizado de caseína caprina con proteasas neutras y alcalinas, siendo este valor casi unas 4 veces más bajo que el obtenido en nuestro caso. Por otro lado, de Gobba *et al.* (2014) no detectó actividad en sus hidrolizados de caseína con proteasas procedentes de *A. ikkense*.

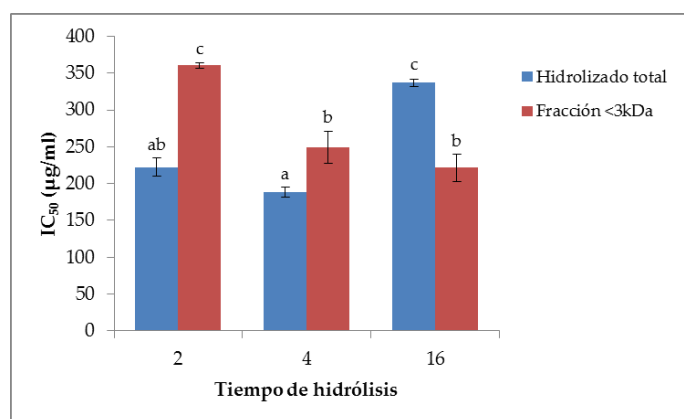


Figura IV. 30. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Los hidrolizados de caseína bovina producidos con proteasas de extracto de flor de alcachofa presentaron grandes diferencias en los distintos ensayos de

actividad antioxidante. Esto demuestra que los métodos de determinación de capacidad de captación de radicales libres, como el radical DPPH y el radical ABTS, no pueden ser sustituidos por otros métodos. La acción captadora de una sustancia frente un tipo de radical libre no puede inferir su habilidad de captación frente a otro tipo de radical, ya que el mecanismo de captación y el método de determinación difieren de unos radicales a otros (Li *et al.*, 2013). Como se puede observar en la Tabla IV.19, el método de determinación de la actividad de captación del radical ABTS fue mucho más sensible que para el radical DPPH, ya que tuvo una equivalencia al Trolox unas 1000 veces mayor (mM vs. μ M).

Tabla IV. 19. TEAC de los hidrolizados totales de caseína bovina de flor de alcachofa frente a los radicales DPPH y ABTS. (Valores de medias y error estándar).

	Tiempo de hidrólisis (horas)		
	2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)
RSA DPPH* Eq μ M Trolox \cdot mg ⁻¹	4,41 \pm 0,51	5,55 \pm 0,61	4,35 \pm 0,72
RSA ABTS** Eq mM Trolox \cdot mg ⁻¹	3,18 \pm 0,08	3,58 \pm 0,11	4,44 \pm 0,40

Este resultado guarda coherencia con los de otros autores: Li *et al.* (2013) encontró un valor de IC₅₀ unas 500 veces menor frente al radical ABTS en comparación al obtenido frente al radical DPPH; Kumar *et al.* (2016a) obtuvo un porcentaje de inhibición 2,5 veces mayor frente al ABTS, y Chang *et al.* (2013) demostró la captación del radical libre ABTS de sus hidrolizados, sin embargo no detectó actividad frente al radical DPPH debido posiblemente a la naturaleza de los compuestos de las muestras, ya que el radical ABTS se solubiliza tanto en agua como en medio orgánico, a diferencia del radical DPPH que es soluble únicamente en disolventes orgánicos (Arnao, 2000). Además de sus diferencias en solubilidad, el radical DPPH no puede reaccionar con ácidos aromáticos con un grupo hidroxilo, o con flavonoides sin un grupo hidroxilo en el anillo β , mientras que el ABTS reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado (Yokozawa *et al.*, 1998; Nanjo *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha descrito la importancia de los aminoácidos hidrofóbicos en la de captación de radicales libres, por lo que los péptidos con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos

podrían incrementar la actividad antioxidante de los hidrolizados (Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). En este sentido, el hidrolizado de cuatro horas, con el mayor ratio de péptidos OH/HI, rindió una mejor actividad quelante del hierro y captadora del radical DPPH.

IV.4.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de caseína bovina.

El efecto de los hidrolizados en los parámetros de crecimiento bacteriano, fase lag, velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, se muestran en la Tabla IV.20. Si analizamos el efecto en el crecimiento microbiano de los hidrolizados sobre los microorganismos Gram negativos testados, se observó efecto inhibitorio estadísticamente significativo respecto a las curvas control ($P \leq 0,01$) para *E. faecalis* en los parámetros de fase lag y crecimiento máximo con los tres tipos de hidrolizados totales. Así mismo, se obtuvo también un aumento significativo ($P \leq 0,01$) de la fase lag cuando se analizó la actividad de las fracciones $< 3\text{kDa}$ de H2 y H16 (Figura IV.31). Se produjo un aumento significativo de la fase lag en *E. coli* ($P \leq 0,05$) con el hidrolizado total de dos horas. En cuanto a la acción de los péptidos sobre los microorganismos Gram positivos tratados, sólo se apreció un aumento de la fase lag en *P. fluorescens*. No se observó inhibición para *L. innocua*.

Si exceptuamos el caso de *E. faecalis*, la acción de los hidrolizados de caseína sobre los microorganismos fue prácticamente inexistente. Esto puede ser debido a la baja concentración final de los hidrolizados en el ensayo (una media de 1,7 mg/mL para los hidrolizados totales y de 0,97 mg/mL para sus ultrafiltrados). De la misma manera, De Gobba *et al.* (2014b) no encontraron actividad antimicrobiana en sus hidrolizados proponiendo también como razón más probable la baja concentración de péptidos bioactivos con posible efecto inhibitorio. Por otro lado, Arruda *et al.* (2012) estudiaron el efecto antimicrobiano de hidrolizados de caseína bovina obtenidos mediante proteasas extraídas del látex de *Jacataria corumbensis* a distintos tiempos de hidrólisis hasta las 24 horas, probando distintas concentraciones de hidrolizados. Únicamente el hidrolizado de dos horas mostró actividad frente a todas las cepas tratadas en el estudio, en un rango de concentración de 250-62,5 mg/mL, siendo la concentración de 50 mg/mL activa sólo frente a *S. aureus*. Sin embargo, López-Expósito *et al.*, (2007)

encontraron actividad antibacteriana en hidrolizados de α_{s2} -caseína ovina y κ -caseína bovina frente a *E. coli* y *L. innocua* a la concentración de 2mg/mL.

Tabla IV. 20. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de caseína bovina. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Parámetros	Control	Tiempo de hidrólisis (horas)		
				2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)
<i>E. faecalis</i>	HT	Lag	301,62 ± 5,7	831,22 ± 27,3**	900 ± 0,0**	876,77 ± 11,8**
		Velocidad	1,19 ± 0,0	0,75 ± 0,5	0,01 ± 0,0	1,34 ± 0,7
		Cto. máx.	0,403 ± 0,01	0,084 ± 0,04**	0,009 ± 0,00**	0,095 ± 0,05**
	<3kDa	Fase Lag	295,55 ± 22,0	625,42 ± 53,4**	417,43 ± 19,7	526,74 ± 32,4**
		Velocidad	1,45 ± 0,1	2,25 ± 0,5	1,67 ± 0,2	1,29 ± 0,1
		Cto. máx.	0,454 ± 0,01	0,348 ± 0,04**	0,407 ± 0,02	0,332 ± 0,02**
<i>E. coli</i>	HT	Fase Lag	394,69 ± 2,62	415,99 ± 2,24*	406,88 ± 8,10	405,20 ± 3,15
		Velocidad	2,59 ± 0,02	2,67 ± 0,18	2,78 ± 0,14	2,86 ± 0,06
		Cto. máx.	0,389 ± 0,01	0,420 ± 0,03	0,432 ± 0,02	0,451 ± 0,01
	<3kDa	Fase Lag	395,32 ± 4,3	417,94 ± 2,7	407,44 ± 15,6	410,84 ± 3,8
		Cto. máx.	0,395 ± 0,02	0,459 ± 0,02	0,428 ± 0,04	0,470 ± 0,02
<i>L. innocua</i>	HT	Fase Lag	332,15 ± 2,0	307,57 ± 1,5>>	298,31 ± 6,9>>	299,94 ± 5,1>>
		Velocidad	1,87 ± 0,03	1,93 ± 0,04	1,97 ± 0,10	1,91 ± 0,08
		Cto. máx.	0,361 ± 0,01	0,398 ± 0,01 ^{>}	0,409 ± 0,01>>	0,400 ± 0,01 ^{>}
	<3kDa	Fase Lag	332,15 ± 2,0	307,56 ± 2,9>>	306,94 ± 0,8>>	292,95 ± 9,7>>
		Velocidad	1,87 ± 0,0	1,89 ± 0,1	2,11 ± 0,0	1,87 ± 0,2
		Cto. máx.	0,361 ± 0,01	0,411 ± 0,01 ^{>}	0,394 ± 0,01	0,386 ± 0,02
<i>P. fluorescens</i>	HT	Fase Lag	312,04 ± 6,6	348,06 ± 10,6**	340,37 ± 7,7*	321,82 ± 5,6
		Velocidad	1,46 ± 0,03	1,48 ± 0,07	1,66 ± 0,08	1,42 ± 0,06
		Cto. máx.	0,891 ± 0,01	0,994 ± 0,01>>	1,049 ± 0,03>>	0,962 ± 0,02 ^{>}
	<3kDa	Fase Lag	312,04 ± 6,6	382,08 ± 7,2**	378,75 ± 7,3**	383,36 ± 9,0**
		Cto. máx.	0,891 ± 0,01	1,010 ± 0,02>>	1,013 ± 0,02>>	0,983 ± 0,015>>

(Fase lag: tiempo en minutos; Velocidad: mUAbs/min; Cto. máx.: crecimiento máximo en UAbs).

Test de Dunnett: *: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.05$); **: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.01$); [>]: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.05$); >>: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.01$). Cuando no aparecen superíndices no hubo efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) del hidrolizado en el parámetro.

Si analizamos el efecto de los hidrolizados sobre el crecimiento de *E. faecalis* (Figura IV.31), observamos que los hidrolizados totales presentaron mayor inhibición que sus fracciones de tamaño molecular <3kDa.

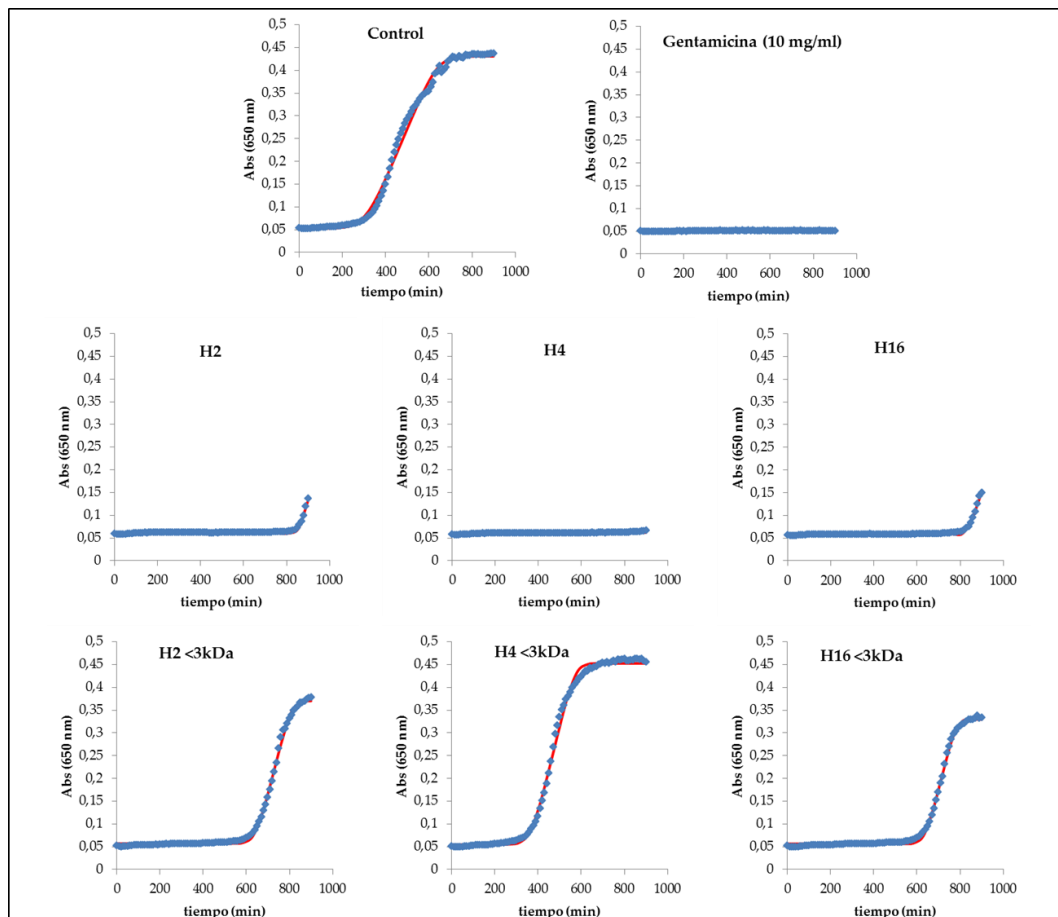


Figura IV. 31. Efecto de los hidrolizados de caseína sobre las curvas de crecimiento de *E. faecalis*.

Este resultado es similar al obtenido por Kumar *et al.* (2016a), donde los hidrolizados enteros presentaron una actividad significativamente mayor que sus fracciones. Estas diferencias entre la actividad antimicrobiana de los hidrolizados totales y sus filtrados pueden ser debidas al tamaño, la naturaleza iónica y la concentración de los péptidos presentes en la solución, ya que la eficacia de los péptidos bioactivos depende de varios factores incluyendo la carga, la diversidad

estructural, la hidrofobicidad y la composición específica de aminoácidos, tales como la histidina, arginina, prolina, cisteína y glicina (Genaro y Zanetti, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002; Andreu y Rivas, 1998). La mayor actividad inhibidora de los hidrolizados totales también puede deberse a la presencia de diferentes péptidos de varios tamaños y cargas, lo que puede contribuir sinérgicamente a su actividad. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Gobbetti *et al.* (2004) que documentaron que el efecto antibacteriano total de la leche fue mayor que la suma de la contribución individual de sus componentes defensivos proteicos, lo que puede atribuirse a una actividad sinérgica entre las proteínas naturales, los péptidos y sustancias precursoras de los mismos.

IV.5. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE OVOALBÚMINA OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L.

Como se ha comentado, se obtuvieron hidrolizados de ovoalbúmina (HT) a distintos tiempos de hidrólisis: 2, 4 y 16 horas (H2, H4 y H16), y de cada tiempo de hidrólisis, mediante ultrafiltración, se obtuvo su fracción de peso molecular menor de 3kDa (<3kDa).

IV.5.1. Concentración peptídica de los hidrolizados de ovoalbúmina.

Se ha determinado la concentración de nitrógeno no proteico (NNP) de cada uno de los HT y sus fracciones <3kDa.

La concentración en NNP de los hidrolizados de ovoalbúmina totales y sus fracciones <3kDa se presenta en la Tabla IV.21. El tiempo de hidrólisis afectó de forma significativa al contenido de NNP, tanto en HT como en la fracción <3kDa ($P \leq 0,01$). De esta manera, los valores de NNP de los HT aumentaron de forma significativa entre las dos, cuatro y dieciséis horas de hidrólisis ($P \leq 0,05$). En el caso de las fracciones <3kDa, H16 fue el que presentó mayor concentración de NNP ($P \leq 0,05$), sin embargo, no hubo diferencias entre los tiempos de hidrólisis de dos y cuatro horas ($P > 0,05$). Nuestros resultados son coherentes con los encontrados por diversos autores en hidrolizados de proteína de clara de huevo, donde el grado de hidrólisis aumentó con el tiempo de hidrólisis, utilizando tanto enzimas de origen vegetal como la papaína (Garcés-Rimón *et al.*, 2016; Chen y Chi, 2011) así como enzimas digestivas de origen animal (Garcés-Rimón *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015; Tanzadehpanah *et al.*, 2013; Zambrowicz *et al.*, 2013b; Chen *et al.*, 2012b; Miguel *et al.*, 2004), de origen microbiano (como la alcalasa, la neutrasa y la termolisina) (Garcés-Rimón *et al.*, 2016; Jakovetic *et al.*, 2015, Chiang *et al.*, 2008) o fúngico (*Flavourzyme*®) (Garcés-Rimón *et al.*, 2016).

Como era de esperar, las fracciones <3kDa mostraron una menor concentración en NNP ($P \leq 0,01$) que los HT a todos los tiempos de hidrólisis. De forma similar, Chiang *et al.*, 2008 describieron una mayor concentración peptídica para su hidrolizado total de clara de huevo elaborado con termolisina (7,95 mg/mL) respecto a su permeado de 3kDa (3,73 mg/mL).

Tabla IV. 21. Efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
NNP	HT	2,35 ± 0,07 _c	2,50 ± 0,04 _d	3,21 ± 0,10 _e	≤0,01	≤0,01	>0,05
	<3kDa	1,31 ± 0,07 _a	1,41 ± 0,00 _a	2,08 ± 0,04 _b			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.
a,b,c,d,e: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$)

IV.5.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de ovoalbúmina.

En la Tabla IV.22 se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis sobre la cantidad de péptidos totales, hidrófobos e hidrofílicos, tanto en los hidrolizados totales como en sus fracciones <3kDa. A la hora de la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que estamos hablando de proporciones relativas a μg de NNP y no a cantidad absoluta en el hidrolizado o en su fracción <3kDa.

Las imágenes de los perfiles cromatográficos de los distintos hidrolizados se muestra en la Figura IV.32.

El tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa ($P \leq 0,01$) en el conjunto del área total cromatográfica de los hidrolizados. De esta manera, se observa un aumento significativo en los HT de cuatro y dieciséis horas respecto al de dos horas ($P \leq 0,05$), siendo el HT de cuatro horas el que más área total cromatográfica presentó por μg de NNP ($P \leq 0,05$). Sin embargo, no se observó variación estadísticamente significativa en cuanto al área total entre tiempos de hidrólisis para las fracciones de peso molecular <3kDa ($P > 0,05$). El peso molecular de los hidrolizados afectó significativamente en el área total cromatográfica ($P \leq 0,01$), siendo menor en las fracciones <3kDa respecto a sus HT en todos tiempos de hidrólisis ($P \leq 0,05$).

El tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa a la concentración de péptidos hidrofílicos ($P \leq 0,01$). Se produjo un aumento significativo de las dos a las cuatro horas de hidrólisis ($P \leq 0,05$), no observándose variación significativa

entre las cuatro y dieciséis horas de hidrólisis ($P>0,05$). Los hidrolizados totales presentaron mayor concentración de péptidos hidrofílicos por μg de NNP respecto a sus fracciones $<3\text{kDa}$ ($P\leq 0,05$).

El tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa a la cantidad de péptidos hidrofóbicos ($P\leq 0,05$). El hidrolizado de cuatro horas total fue el que presentó mayor concentración de péptidos hidrofóbicos ($P\leq 0,05$), no apareciendo diferencias notables entre H2 y H16 ($P>0,05$). No se presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de péptidos hidrofóbicos para las fracciones $<3\text{kDa}$ a los distintos tiempos de hidrólisis ($P>0,05$), aunque se observó una ligera tendencia descendente. Los hidrolizados totales presentaron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos por μg de NNP que sus fracciones $<3\text{kDa}$ a los tres tiempos de hidrólisis ($P\leq 0,05$).

Tabla IV. 22. Efecto del tiempo de la hidrólisis en el la cantidad de péptidos de los hidrolizados de ovoalbúmina, expresada en área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
Total/ μg	HT	$154,36 \cdot 10^4 \pm 9,0 \cdot 10^4_b$	$247,05 \cdot 10^4 \pm 15,4 \cdot 10^4_d$	$203,59 \cdot 10^4 \pm 11,7 \cdot 10^4_c$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
	$<3\text{kDa}$	$73,29 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4_a$	$82,06 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_a$	$61,74 \cdot 10^4 \pm 6,9 \cdot 10^4_a$			
HI/ μg	HT	$30,84 \cdot 10^4 \pm 0,7 \cdot 10^4_b$	$57,49 \cdot 10^4 \pm 0,4 \cdot 10^4_c$	$51,15 \cdot 10^4 \pm 8,5 \cdot 10^4_c$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$> 0,05$
	$<3\text{kDa}$	$19,91 \cdot 10^4 \pm 0,4 \cdot 10^4_a$	$36,37 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_b$	$31,31 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4_b$			
HO/ μg	HT	$123,52 \cdot 10^4 \pm 8,7 \cdot 10^4_b$	$189,56 \cdot 10^4 \pm 14,9 \cdot 10^4_c$	$152,44 \cdot 10^4 \pm 20,2 \cdot 10^4_b$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$
	$<3\text{kDa}$	$53,38 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^4_a$	$45,69 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_a$	$30,43 \cdot 10^4 \pm 5,4 \cdot 10^4_a$			
HO/HI	HT	$4,00 \pm 0,25_d$	$3,29 \pm 0,23_{bc}$	$3,30 \pm 0,98_{bc}$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$> 0,05$
	$<3\text{kDa}$	$2,68 \pm 0,06_b$	$1,26 \pm 0,04_a$	$0,96 \pm 0,13_a$			

(Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.
a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P\leq 0,05$)

El tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa al ratio de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos (HO/HI) de los hidrolizados de ovoalbúmina ($P\leq 0,05$). En este caso, el hidrolizado de dos horas, tanto en su totalidad como en la fracción

<3kDa, fue el que mayor ratio HO/HI presentó ($P \leq 0,05$), siendo menor a las cuatro y dieciséis horas de hidrólisis por contener estos hidrolizados mayor concentración de péptidos hidrofílicos respecto al hidrolizado de dos horas. No hubo diferencias significativas entre los hidrolizados de cuatro y dieciséis horas de hidrólisis para el ratio HO/HI tanto en su totalidad como en sus fracciones <3kDa ($P > 0,05$).

No se ha encontrado bibliografía respecto a la concentración total y proporción de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos en hidrolizados de clara de huevo. Sin embargo si se han encontrado publicaciones describiendo la composición de aminoácidos de los hidrolizados y en ocasiones, el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos de los mismos (Chen *et al.*, 2012b; Ren *et al.*, 2014a; Sun *et al.*, 2014; You y Wu, 2011). Normalmente, el contenido de aminoácidos hidrofóbicos y su valor hidrofóbico, determina la hidrofobicidad de los hidrolizados (Ren *et al.*, 2014a). Si atendemos al porcentaje de área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos sobre el área cromatográfica total de los hidrolizados (Tabla IV.23), como hemos visto anteriormente en la relación HO/HI, el porcentaje de péptidos hidrofóbicos baja con el tiempo de hidrólisis, siendo menor en la fracción <3kDa.

La fracción <3kDa de H16 tuvo un 49,29% de péptidos hidrofóbicos. Este valor es similar al indicado en diferentes estudios sobre hidrolizados de proteína de clara de huevo en cuanto al porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos. Por ejemplo, Ren *et al.* (2014a) obtuvieron un 48,51% de aminoácidos hidrofóbicos en un hidrolizado de proteína de clara de huevo de pato preparado mediante una combinación enzimática con una hidrolasa específica para la proteína de huevo y alcalasa. Sun *et al.* (2014) reportaron un 43,23% de aminoácidos hidrofóbicos en la fracción de 2-5 kDa de un hidrolizado de clara de huevo elaborado con pepsina. Liu *et al.* (2015) determinaron un 42,76% de aminoácidos hidrofóbicos en la fracción <1kDa de un hidrolizado de proteína de clara de huevo con alcalasa. Chen *et al.* (2012b), en el hidrolizado de clara de huevo con tripsina, obtuvieron unos porcentajes de aminoácidos hidrofóbicos de 44,93 y 49,28, para el hidrolizado total y su fracción <3kDa, respectivamente. Chen y Chi (2011) indicaron un 46,97% de aminoácidos hidrofóbicos en su hidrolizado de clara de huevo preparado con papaína durante 3 horas de hidrólisis. De la misma manera, Yow y Wu (2011) realizaron diferentes hidrolizados a partir de proteína de clara

de huevo con termolisina, alcalasa y una combinación de pepsina y pancreatina a un tiempo de hidrólisis de tres horas, obteniendo un 44,46%, 43,55% y 44,80% de aminoácidos hidrofóbicos para cada uno de ellos, respectivamente.

Tabla IV. 23. Porcentaje de área cromatográfica correspondiente a péptidos hidrofóbicos sobre el área total de la muestra de los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L.

	Tiempo de hidrólisis (horas)		
	2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)
HT	80,02%	76,73%	74,88%
<3kDa	72,83%	55,68%	49,29%

Tal y como se ha explicado en el caso de los hidrolizados de caseína, conocer la concentración de péptidos hidrofóbicos en los hidrolizados es de gran interés ya que se ha descrito su importancia en la actividad IECA-I y antioxidante de los mismos. La hidrofobicidad y la carga positiva de los aminoácidos podría mejorar su unión a la ECA (Kobayashi *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2004). Además, la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en los péptidos podría implicar una gran potencia antioxidante, ya que estos aminoácidos podrían proporcionar hidrógeno a especies reactivas del oxígeno (Guo *et al.*, 2009). Por otra parte, uno de los principales factores que otorgan actividad antimicrobiana a los péptidos es la alta proporción de residuos hidrofóbicos (Nguyen *et al.*, 2011).

Si nos fijamos en las imágenes de los perfiles cromatográficos de los hidrolizados a distintos tiempos de hidrólisis, aunque la intensidad de los picos principales se ve incrementada con el tiempo de hidrólisis, en general el conjunto del perfil cromatográfico es similar entre los diferentes hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L., al igual que pasaba con los hidrolizados de caseína. Este perfil constante en los picos durante el tiempo de hidrólisis podría indicar que las proteasas presentes en el extracto de *C. scolymus* L. poseen cierta especificidad de anclaje en los enlaces peptídicos, de forma similar a lo descrito en Corrons *et al.* (2017) para las proteasas obtenidas de un extracto de látex de *Maclura pomifera*. Los picos de los cromatogramas de las

fracciones <3kDa, debido al bajo peso molecular y al tratarse de los filtrados de HT, presentan menor intensidad en todos los casos que su HT.

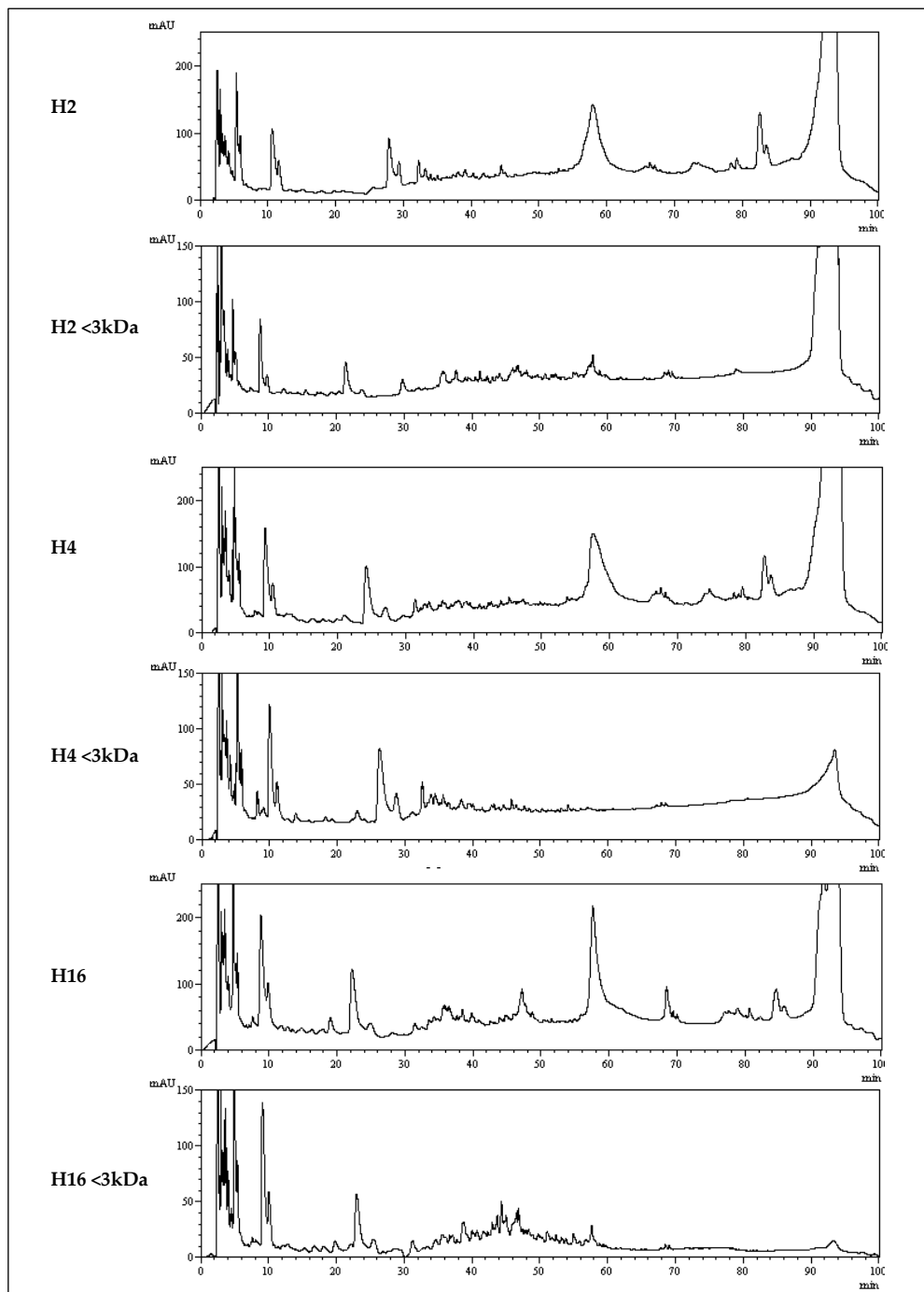


Figura IV. 32. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos a partir de un extracto de flor de *C. scolyms* L.

IV.5.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de ovoalbúmina.

En la Tabla IV.24 y la Figura IV.33, se muestran los porcentajes de actividad IECA de los HT de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. a distintos tiempos de hidrólisis, así como de sus fracciones de peso molecular <3kDa.

El tiempo de hidrólisis en general no influyó de manera significativa en la actividad IECA-I de los hidrolizados de ovoalbúmina ($P>0,05$), aunque si atendemos a los hidrolizados totales, H4 y H16 mostraron mayor actividad (86,07% y 86,78%, respectivamente) que H2 (79,64%) ($P\leq 0,05$). Para las fracciones <3kDa no hubo diferencias significativas en la actividad IECA-I entre los distintos tiempos de hidrólisis ($P>0,05$). Estos resultados están relacionados con los encontrados por diversos autores que observaron que hay un grado óptimo de hidrólisis en la formación de una alta concentración de péptidos con actividad IECA-I (Chen *et al.*, 2012b; Quirós *et al.*, 2007a). Así, Chiang *et al.* (2008) describieron que después de dos-cuatro horas de tiempo de hidrólisis la actividad IECA de los hidrolizados se estabilizaba; Tanzadehpanah *et al.* (2013) encontraron que en los primeros intervalos de hidrólisis la actividad IECA de los hidrolizados aumentaba hasta alcanzar su máximo a las 4 horas de hidrólisis; Chen *et al.* (2012b) obtuvieron un máximo de actividad IECA a las 5 horas de hidrólisis, y Quirós *et al.* (2007a) describieron que la actividad IECA de los hidrolizados aumentaba con el tiempo de hidrólisis hasta las ocho horas.

Tabla IV. 24. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA de los hidrolizados de ovoalbúmina a la concentración de 125 µg/mL. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
% IECA	HT	79,64 ± 0,06 _b	86,07 ± 0,99 _a	86,78 ± 1,75 _a	>0,05	≤0,01	≤0,05
	<3kDa	90,21 ± 1,68 _a	87,55 ± 2,63 _a	89,87 ± 0,21 _a			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

a,b: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P\leq 0,05$).

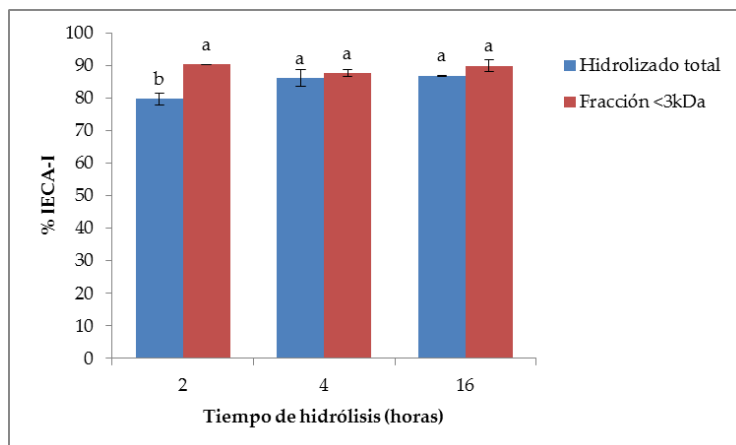


Figura IV. 33. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Sin embargo, el tamaño molecular de los péptidos influyó de manera significativa en la actividad IECA-I ($P \leq 0,01$), siendo las fracciones <3kDa de los hidrolizados las que mostraron mayor porcentaje de inhibición en todos los casos, aunque no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre la actividad IECA de los hidrolizados totales H4 y H16 (86,07% y 86,78%, respectivamente) y sus fracciones <3kDa (87,55% y 89,87%). Estos resultados guardan coherencia con los observados en otros estudios donde se atribuyó a los péptidos de menor peso molecular la actividad IECA principal de los hidrolizados (Chiang *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2004).

Nuestro hidrolizado de ovoalbúmina de 16 horas tuvo una IC_{50} de $69,55 \pm 3,12 \mu\text{g}/\text{mL}$, y su fracción <3kDa de $64,06 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{mL}$. Estos valores son más bajos (indicando mayor actividad) que los encontrados en la bibliografía en hidrolizados de ovoalbúmina con proteasas de origen vegetal. Por ejemplo, en la hidrólisis de clara de huevo con la proteasa comercial Promod 144P procedente de *Carica papaya*, se obtuvo una IC_{50} óptima de $78,7 \mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas de hidrólisis (Garcés-Rimón *et al.*, 2016). Pokora *et al.* (2014) prepararon hidrolizados de proteína de clara de huevo con proteasas extraídas de *Cucurbita ficifolia*, obteniendo actividad IECA tras cinco horas de hidrólisis con una IC_{50} de $9071 \mu\text{g}$,

siendo esta IC_{50} mucho mayor a la obtenida para nuestro hidrolizado de ovoalbúmina elaborado con extracto de *C. scolymus* L.. De forma similar, Chen y Chi (2011) obtuvieron un hidrolizado de proteína de clara de huevo elaborado con papaína a un tiempo de hidrólisis de tres horas que rindió un IC_{50} de 1,676 mg/mL, siendo esta concentración unas 24 veces mayor que en nuestro caso.

Por otro lado, se han realizado numerosos estudios con la utilización de proteasas de origen animal o microbiano en la preparación de hidrolizados de proteína de clara de huevo para obtener péptidos bioactivos, obteniendo en varios trabajos menor actividad IECA que la demostrada por nuestros hidrolizados elaborados con extracto de alcachofa. Por ejemplo, Huang *et al.* (2015) describieron un 70,55% de inhibición de la ECA en un hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina a un tiempo de hidrólisis de aproximadamente 4 horas, siendo este porcentaje de actividad menor que el observado en nuestros hidrolizados de dos, cuatro y dieciséis horas. Abeyrathne *et al.* (2014) utilizaron combinaciones de alcalasa, papaína, pepsina, tripsina y quimotripsina para producir péptidos con actividad IECA-I a partir de ovoalbúmina, obteniendo menos del 80% de inhibición en todos los casos. Tanzadehpanah *et al.* (2013) utilizaron la tripsina para la producción de hidrolizados de clara de huevo de avestruz, obteniendo porcentajes de inhibición de sus hidrolizados entre un 28 y 57%. Zambrowicz *et al.* (2013b), a partir de pepsina, obtuvieron un hidrolizado de tres horas con una IC_{50} de 643,1 μ g/mL, siendo esta concentración unas nueve veces mayor que la obtenida para nuestro hidrolizado de dieciséis horas. Chen *et al.* (2012b), observaron la mayor actividad IECA (un 50,61%) a las cinco horas de hidrólisis en un hidrolizado de clara de huevo con tripsina, utilizando una concentración de hidrolizado de 1 mg/mL, ocho veces mayor que la utilizada en nuestro caso (0,125 mg/mL). You y Wu (2011) indicaron que los hidrolizados de proteína de clara de huevo producidos con enzimas de origen microbiano (termolisina y alcalasa) mostraron mayor actividad IECA que los producidos con enzimas gastrointestinales, obteniendo una IC_{50} entre 96,2 y 268 μ g/mL. Liu *et al.* (2010) encontraron una actividad IECA del 58% en un hidrolizado de proteína de clara de huevo con alcalasa a las tres horas de hidrólisis, obteniéndose una fracción purificada de este hidrolizado que dio una IC_{50} de 180 μ g/mL, siendo esta IC_{50} unas 2,6 veces mayor que la obtenida para nuestro H16.

Por otra parte, también se han encontrado estudios que demostraron actividad IECA ligeramente superior que la de nuestros hidrolizados. Garcés-Rimón *et al.* (2016) describieron actividad IECA-I con una IC_{50} de $\approx 50 \mu\text{g/mL}$ en el hidrolizado de clara de huevo de 4-8 horas de hidrólisis preparado con pepsina gástrica porcina. De forma similar Miguel *et al.* (2004) indicaron que la pepsina rindió péptidos con mayor actividad IECA en comparación a la tripsina y la quimotripsina, con una IC_{50} para el hidrolizado total de tres horas de $55,3 \mu\text{g/mL}$ y de $34,5 \mu\text{g/mL}$ para su fracción $<3\text{kDa}$. Por otro lado Chiang *et al.* (2008) obtuvieron un hidrolizado de proteína de clara de huevo preparado con termolisina con actividad IECA a un tiempo de hidrólisis entre dos y cuatro horas, presentando una IC_{50} de $54,1 \mu\text{g/mL}$ para el hidrolizado total y de $22,6 \mu\text{g/mL}$ para su fracción $<3\text{kDa}$.

Podemos afirmar que los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos mediante la acción del extracto de flor de *C. scolymus* L. incluso a períodos cortos de hidrólisis, presentan una potente actividad IECA-I *in vitro*, en comparación con los descritos en otros estudios utilizando otras enzimas de origen vegetal, animal y microbiano, demostrándose la importancia de la especificidad de la proteinasa usada en la producción de péptidos bioactivos (Abubakar *et al.*, 1998; Mullally *et al.*, 1997a, 1997b). Esto puede ser debido a que las proteinasas aspárticas de flores de varias especies del género *Cynara*, tienen una elevada acción proteolítica que conduce a una fragmentación intensa (Galán *et al.*, 2008), produciéndose péptidos pequeños. Además, nuestros hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa presentaron una alta concentración de péptidos hidrofóbicos lo que puede explicar la mayor actividad IECA de los mismos (Cheung *et al.*, 1980).

IV.5.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe^{2+} de los hidrolizados de ovoalbúmina.

Los resultados de actividad antioxidante frente al radical DPPH de los hidrolizados de ovoalbúmina se presentan en la Tabla IV.25 y Figura IV.34.

El tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa a la actividad antioxidante de los hidrolizados frente al radical DPPH ($P \leq 0,01$). De la misma manera, han sido varios los autores los que han observado la influencia del tiempo de hidrólisis así como del grado de hidrólisis en la captación del radical

DPPH (RSA) de hidrolizados enzimáticos de proteína de clara de huevo (Zambrowicz *et al.*, 2013a; Chen *et al.*, 2012a, 2012b).

Tabla IV. 25. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			<i>P</i> ¹	<i>P</i> ²	<i>P</i> ³
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
% RSA	HT	67,46 ± 0,40 _a	68,30 ± 0,84 _a	72,51 ± 0,33 _c	≤0,01	≤0,05	>0,05
	<3kDa	68,83 ± 0,52 _a	69,01 ± 0,58 _b	74,09 ± 0,40 _c			
Eq μM Trolox/mg	HT	16,54 ± 0,39 _b	15,72 ± 0,43 _b	13,03 ± 0,44 _a	≤0,01	≤0,01	≤0,01
	<3kDa	30,27 ± 1,51 _e	28,13 ± 0,23 _d	20,53 ± 0,50 _c			

ANOVA: *P*¹: tiempo de hidrólisis; *P*²: tamaño molecular; *P*³: interacción tiempo-tamaño molecular.
a,b,c,d,e: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, *P*≤0,05).

Si nos fijamos en el porcentaje de captación de radical DPPH de los hidrolizados, la actividad aumenta con el tiempo de hidrólisis (*P*≤0,05), esto es debido sin duda a la mayor concentración peptídica de los hidrolizados a mayor tiempo de hidrólisis. En varios estudios con hidrolizados de proteína de clara de huevo se ha observado una actividad dosis-dependiente en la captación del radical DPPH, aumentando dicha actividad con la concentración de hidrolizado (Chen y Chi, 2011; Chen *et al.*, 2012a, 2012b; Liu *et al.*, 2015).

Si atendemos al TEAC (actividad equivalente al Trolox) por mg de péptidos, la capacidad antioxidante disminuyó con el tiempo de hidrólisis, siendo H2 el hidrolizado más potente en la captación del radical DPPH con un valor de TEAC de 16,54 μM Trolox/mg. Precisamente, el ratio de concentración de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos también disminuyó con el tiempo de hidrólisis, siendo el H2 el que presentó mayor ratio de péptidos hidrofóbicos. Esto puede ser debido a que la mayor presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en los péptidos podría otorgar mayor potencia antioxidante a los hidrolizados ya que estos aminoácidos proporcionan hidrógeno a las especies reactivas de oxígeno (Guo *et al.*, 2009). Por otra parte, en ensayos de capacidad antioxidante con sistemas liposolubles, como es el caso del radical

DPPH, la hidrofobicidad de los péptidos es un factor importante en la actividad de captación del radical libre (Chen *et al.*, 1998).

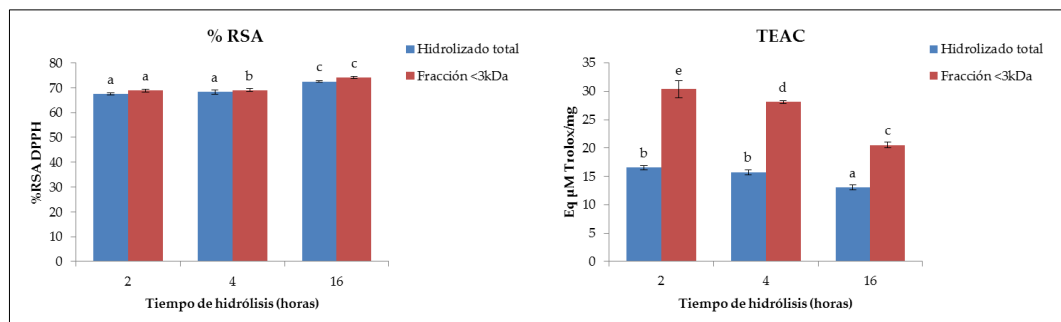


Figura IV. 34. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular en la actividad antioxidante frente al DPPH \cdot , expresado en porcentaje y TEAC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

El peso molecular de los péptidos también afectó de manera significativa a la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de ovoalbúmina ($P \leq 0,05$), siendo la fracción <3kDa más potente que el hidrolizado total a los tres tiempos de hidrólisis. Estos resultados son similares a los encontrados en otros trabajos donde las fracciones de menor peso molecular demostraron una actividad significativamente mejor que los hidrolizados totales (Liu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2012a). Si atendemos al porcentaje de captación del DPPH \cdot , H16 <3kDa fue la muestra que presentó una mayor actividad con un 74,09% de captación del radical, sin embargo si atendemos al TEAC, H2<3kDa fue la muestra más potente con un valor de 30,27 μM Trolox/mg de péptidos. De igual manera, Chen *et al.* (2012a) describieron una mejor actividad, a la concentración de 5 mg/mL, en la fracción <3kDa (78,74%) que en el total (73,14%) de hidrolizados de proteína de clara de huevo elaborados con papaína durante tres horas de hidrólisis, siendo la concentración de muestra utilizada unas cinco veces mayor que la utilizada en nuestros ensayos. Nuestros resultados también mostraron mayor actividad frente al DPPH \cdot que los encontrados para la fracción <1kDa de un hidrolizado de proteína de clara de huevo con alcalasa con un 39,51% de captación del radical (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, en hidrolizados de huevo de avestruz con pepsina y pancreatina, Homayouni-Tabrizi *et al.* (2015)

observaron una captación del radical del 88,3% a una concentración de 1mg/mL de hidrolizado. Y Sun *et al.* (2014) indicaron un 98,93% de captación del radical DPPH para la fracción de 2-5 kDa de su hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

En la Tabla IV.26 y Figura IV.35, se muestran el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular de los hidrolizados en la acción captadora del radical ABTS.

Tabla IV. 26. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS•⁺ de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			<i>P</i> ¹	<i>P</i> ²	<i>P</i> ³
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
RSA IC₅₀ (µg/mL)	HT	7,84 ± 0,23 _{ab}	7,81 ± 0,12 _{ab}	6,92 ± 0,14 _{cd}	≤0,01	>0,05	≤0,05
	<3kDa	8,39 ± 0,35 _a	7,27 ± 0,09 _{bc}	6,65 ± 0,04 _d			
Eq mM Trolox·mg⁻¹	HT	3,65 ± 0,11 _a	3,66 ± 0,06 _{ab}	4,13 ± 0,09 _{cd}	≤0,01	>0,05	≤0,05
	<3kDa	3,42 ± 0,15 _a	3,93 ± 0,05 _{bc}	4,30 ± 0,03 _d			

ANOVA: *P*¹: tiempo de hidrólisis; *P*²: tamaño molecular; *P*³: interacción tiempo-tamaño molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, *P*≤0,05).

Se observó que el tiempo de hidrólisis afectó de manera significativa en la actividad antioxidante frente al radical ABTS de los hidrolizados de ovoalbúmina con *C. scolyms* L. (*P*≤0,01), produciéndose una disminución de la IC₅₀ y a la vez un incremento del TEAC, indicando una mayor potencia antioxidante de los hidrolizados. Así, H16 y su fracción <3kDa fue el hidrolizado con mayor capacidad antioxidante frente al radical ABTS (*P*≤0,05), presentando una IC₅₀ de 6,92 y 6,65 µg/mL, respectivamente. De la misma manera, Noh y Suh (2015) describieron la disminución de la IC₅₀ con el tiempo de hidrólisis en hidrolizados de clara de huevo líquida preparados con alcalasa, consiguiendo el valor más bajo de IC₅₀ a las 32 horas hidrólisis (0,84 mg/mL) y siendo esta concentración aproximadamente unas 120 veces superior a la encontrada en nuestro hidrolizado de ovoalbúmina con extracto de flor de alcachofa a las 16 horas de hidrólisis.

Por otra parte el tamaño molecular no afectó a la capacidad captadora del radical ABTS de los hidrolizados de ovoalbúmina ($P>0,05$). Este resultado sin embargo, difiere con lo descrito por Liu *et al.* (2015) que encontró una mayor actividad frente al ABTS^{•+} en los péptidos de peso molecular <3kDa.

Nuestros hidrolizados mostraron una potente actividad antioxidante frente al radical ABTS. Así nuestro hidrolizado de 16 horas dio un valor de IC₅₀ unas 51 veces menor (indicando mayor actividad) que el encontrado por Homayouni-Tabrizi *et al.* (2014) para un hidrolizado de clara de huevo de avestruz con pepsina y pancreatina (6,92 µg/mL *vs.* 0,36 mg/mL). Por otro lado, You y Wu (2011) encontraron en hidrolizados de clara de huevo con pepsina/pancreatina, termolisina y alcalasa una actividad captadora del radical ABTS entre 2,01-2,14 µmol Trolox/mg, siendo estos valores de TEAC mayores que los encontrados para nuestros hidrolizados a partir de extracto de flor de alcachofa (0,91-1,03 µmol Trolox/mg).

Nuestros resultados muestran que los hidrolizados de ovoalbúmina elaborados con extracto de flor de *C. scolymus* L. posiblemente contienen péptidos que actúan como donantes de electrones y pueden reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables.

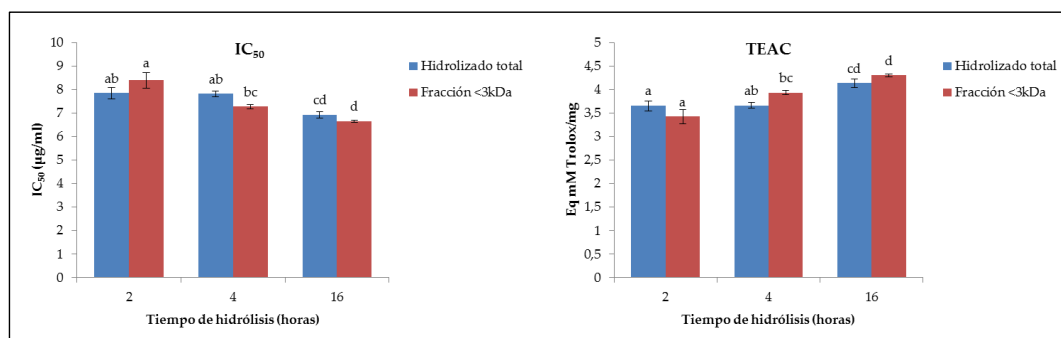


Figura IV. 35. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad captadora del ABTS^{•+} de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$)).

En referencia a la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L., en la Tabla IV.27 y Figura

IV.36 se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis y el peso molecular en los valores de IC_{50} obtenidos para los hidrolizados y sus fracciones <3kDa.

El tiempo de hidrólisis y el peso molecular afectaron de manera significativa ($P \leq 0,01$) en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L.

Tabla IV. 27. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

		Tiempo de hidrólisis (horas)			P^1	P^2	P^3
		2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)			
AQFe²⁺	HT	56,03 ± 6,73 _a	48,47 ± 0,87 _a	51,03 ± 2,11 _a	≤0,01	≤0,01	≤0,01
IC₅₀ (µg/mL)	<3kDa	32,18 ± 1,54 _b	36,65 ± 1,29 _b	54,00 ± 0,94 _a			

ANOVA: P^1 : tiempo de hidrólisis; P^2 : tamaño molecular; P^3 : interacción tiempo-tamaño molecular.

a,b: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Respecto al efecto del tiempo de hidrólisis, si atendemos a los hidrolizados totales H4 fue el que presentó un valor de IC_{50} más bajo (48,47 µg/mL) ($P > 0,05$). Precisamente H4 fue el hidrolizado con mayor concentración de péptidos hidrofóbicos. Estos resultados guardan coherencia con los obtenidos por Zambrowicz *et al.* (2013a) donde los diferentes hidrolizados de proteína de clara de huevo mostraron actividad quelante del hierro, aumentando dicha actividad con el tiempo y el grado de hidrólisis. Sin embargo, para las fracciones <3kDa la actividad quelante del hierro (II) disminuyó con el tiempo de hidrólisis de manera significativa ($P \leq 0,05$), siendo H2<3kDa la muestra que presentó mayor actividad quelante del hierro (II) con un valor de IC_{50} de 32,18 µg/mL. Justamente, H2<3kDa fue la muestra que presentó el mayor ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos.

El peso molecular de los péptidos afectó de manera significativa a la actividad quelante del hierro (II) ($P \leq 0,01$), siendo las fracciones <3kDa las que mostraron mayor potencia quelante ($P \leq 0,05$) para los hidrolizados de dos y cuatro horas. No obstante, en el caso de H16 no se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el HT y su fracción <3kDa.

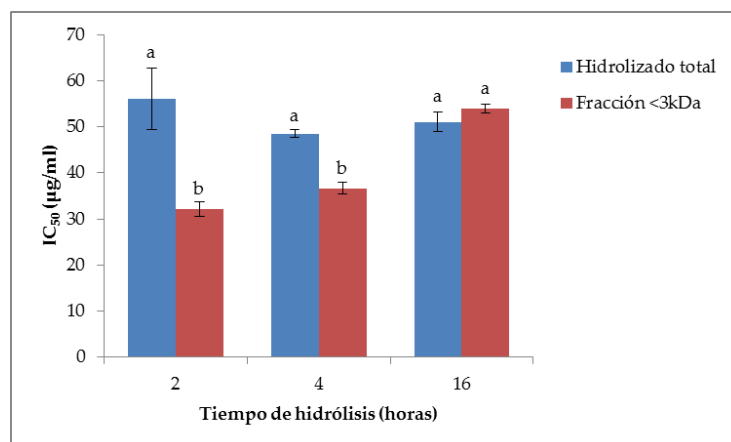


Figura IV. 36. Efecto del tiempo de hidrólisis y el tamaño molecular de los péptidos en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de alcachofa presentaron actividad quelante del hierro (II), siendo los valores de IC_{50} encontrados para nuestros hidrolizados más bajos (indicando mayor actividad) que los descritos por Baratzadeh *et al.* (2013) para dos péptidos purificados a partir del hidrolizado de proteína de clara de huevo de oca con papaína, rindiendo una $IC_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Los hidrolizados de ovoalbúmina producidos con proteasas de extracto de flor de alcachofa presentaron grandes diferencias entre los distintos ensayos de actividad antioxidante. Debido a que existen diferentes vías de acción antioxidante, se logra una mejor caracterización de la actividad antioxidante utilizando diferentes ensayos basados en diferentes mecanismos de acción y diferentes medios (Moure *et al.*, 2006). La actividad de los hidrolizados frente al radical DPPH fue sustancialmente menor a la mostrada en la inhibición del radical ABTS, con valores de TEAC de $\mu\text{M Trolox}/\text{mg}$ vs. $\text{mM Trolox}/\text{mg}$. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos con hidrolizados enzimáticos de proteína de clara huevo (Jakovetic *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Noh y Suh, 2015). La razón de estas diferencias se debe probablemente a la distinta solubilidad y difusión de los radicales utilizados (Zhu *et al.*, 2008). El DPPH, al ser un compuesto liposoluble, a pesar de estar disuelto en alcohol, puede no llegar a difundir bien a los péptidos diana en disolución acuosa, por lo tanto su

reactividad podría ser limitada. Al contrario, especies radicales solubles en agua como el ABTS^{•+}, podrían mostrarse más accesibles a los péptidos en solución acuosa y así reaccionar de manera más eficiente con los péptidos de los hidrolizados (Noh y Su, 2015). Además, con el mayor tiempo de hidrólisis se producen más cantidad de péptidos de cadena corta y aminoácidos, que son hidrofílicos y por lo tanto reaccionan más fácilmente con el radical ABTS que con el DPPH (Zhu *et al.*, 2008). Así, hemos visto que la actividad de nuestros hidrolizados frente al radical ABTS aumentaba con el tiempo de hidrólisis, justamente al contrario que lo ocurrido cuando se trataba del radical DPPH.

Por otra parte, se ha descrito la importancia de los aminoácidos hidrofóbicos en la captación de radicales libres (Chen *et al.*, 1996), por lo que los péptidos con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos podrían incrementar la actividad antioxidante de los hidrolizados. En este sentido, el hidrolizado de dos horas, con el mayor ratio de péptidos OH/HI, rindió una mejor actividad quelante del hierro y captadora del radical DPPH.

IV.5.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de ovoalbúmina.

El efecto de los hidrolizados en los parámetros de crecimiento bacteriano, fase lag, velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, se muestran en la Tabla IV.28.

Si analizamos el efecto en el crecimiento microbiano de los hidrolizados sobre los microorganismos Gram negativos testados, únicamente se observó efecto inhibitorio estadísticamente significativo respecto a las curvas control ($P \leq 0,05$) para *E. faecalis* en el parámetro de velocidad de crecimiento con H2 y con las fracciones <3kDa de los distintos tiempos de hidrólisis. No obstante, la fase lag se vio acortada ($P \leq 0,01$) y no hubo cambios en el crecimiento máximo del microorganismo ($P > 0,05$). Respecto a *E. coli* no se detectó efecto antimicrobiano de los hidrolizados sobre las curvas de crecimiento. No hubo efecto antimicrobiano de los hidrolizados frente a los microorganismos Gram positivos testados, *L. innocua* y *P. fluorescens*.

Tabla IV. 28. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

Especie	Tamaño	Parámetros	Control	Tiempo de hidrólisis (horas)		
				2 (n=3)	4 (n=3)	16 (n=3)
<i>E. faecalis</i>	HT	Lag	719,78 ± 15,7	586,74 ± 8,2 ^{>>}	598,00 ± 12,6 ^{>>}	648,94 ± 12,7
		Velocidad	3,73 ± 0,2	2,96 ± 0,2*	3,15 ± 0,2	3,79 ± 0,2
		Cto. máx	0,566 ± 0,03	0,579 ± 0,01	0,581 ± 0,01	0,551 ± 0,01
	<3kDa	Lag	719,78 ± 15,7	554,50 ± 10,24 ^{>>}	574,88 ± 14,0 ^{>>}	614,04 ± 21,2 ^{>>}
		Velocidad	3,73 ± 0,2	2,50 ± 0,1**	2,65 ± 0,2**	2,88 ± 0,2**
		Cto. máx	0,566 ± 0,03	0,555 ± 0,00	0,557 ± 0,01	0,535 ± 0,01
<i>E. coli</i>	HT	Lag	289,29 ± 6,5	319,00 ± 39,4	352,21 ± 41,5	265,96 ± 34,7
		Velocidad	1,72 ± 0,1	1,74 ± 0,3	1,87 ± 0,3	1,87 ± 0,2
		Cto. máx	0,638 ± 0,01	0,631 ± 0,09	0,663 ± 0,08	0,809 ± 0,06 ^{>}
	<3kDa	Lag	289,29 ± 6,5	294,90 ± 12,6	295,03 ± 12,6	252,16 ± 15,8
		Velocidad	1,72 ± 0,1	1,87 ± 0,1	2,00 ± 0,2	1,40 ± 0,1
		Cto. máx	0,638 ± 0,01	0,673 ± 0,01	0,684 ± 0,01	0,679 ± 0,01
<i>L. innocua</i>	HT	Lag	307,71 ± 0,8	234,53 ± 15,2 ^{>>}	240,30 ± 11,8 ^{>>}	250,46 ± 7,0 ^{>>}
		Velocidad	2,38 ± 0,0	2,01 ± 0,2	1,93 ± 0,2 ^{>}	2,00 ± 0,1
		Cto. máx	0,422 ± 0,00	0,526 ± 0,01	0,623 ± 0,07	0,714 ± 0,14 ^{>>}
	<3kDa	Lag	307,71 ± 0,8	263,48 ± 4,9 ^{>>}	250,52 ± 15,9 ^{>>}	267,84 ± 1,8 ^{>}
		Velocidad	2,38 ± 0,0	1,83 ± 0,1 ^{>}	1,63 ± 0,1 ^{>>}	1,87 ± 0,2 ^{>>}
		Cto. máx	0,422 ± 0,00	0,395 ± 0,02	0,417 ± 0,02	0,373 ± 0,02
<i>P. fluorescens</i>	HT	Lag	257,43 ± 6,7	221,83 ± 24,4	206,61 ± 29,2	173,91 ± 32,8 ^{>}
		Velocidad	1,13 ± 0,0	1,32 ± 0,1	1,14 ± 0,1	0,98 ± 0,2
		Cto. máx	0,721 ± 0,01	1,003 ± 0,03 ^{>>}	0,988 ± 0,03 ^{>>}	0,830 ± 0,07
	<3kDa	Lag	257,43 ± 6,7	255,8 ± 22,6	285,4 ± 6,2	209,9 ± 15,3
		Velocidad	1,13 ± 0,0	1,29 ± 0,1	1,47 ± 0,0 ^{>}	1,09 ± 0,1
		Cto. máx	0,721 ± 0,01	0,991 ± 0,04 ^{>>}	1,081 ± 0,01 ^{>>}	0,872 ± 0,03 ^{>>}

(Lag: Fase Lag en minutos; Velocidad: velocidad de crecimiento en mUAbs/min; Cto. máx.: crecimiento máximo en UAbs).

Test de Dunnett: *: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.05$); **: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.01$); [>]: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.05$); ^{>>}: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0.01$). Cuando no aparecen superíndices no hubo efecto estadísticamente significativo ($P > 0,05$) del hidrolizado en el parámetro.

No se han encontrado muchos estudios en la bibliografía sobre actividad antimicrobiana en hidrolizados de ovoalbúmina o clara de huevo de gallina u otras especies avícolas. La mayoría de estudios encontrados sobre actividad antimicrobiana en hidrolizados de huevo se basan en la hidrólisis de lisozima de clara de huevo. La lisozima es una enzima que de por sí ha demostrado actividad antimicrobiana siendo capaz de hidrolizar los enlaces β entre el ácido N-acetilneurámico y la N-acetil glucosamina de las paredes bacterianas (Yu *et al.*, 2014b). Memarpoor-Yazdi *et al.* (2012a) aislaron el péptido NTDGSTDYGILQINSR a partir de la hidrólisis de lisozima de clara de huevo de gallina con una combinación enzimática de papaína y tripsina. Este péptido mostró actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *L. mesenteroides*. También Thammasirirak *et al.* (2010) a partir de la hidrólisis de lisozima de clara de huevo de oca con pepsina y tripsina, aislaron el péptido TAKPEGLSY, que demostró tener actividad frente a *V. cholerae* y *S. epidermidis*. Del mismo modo, Mine *et al.* (2004) aislaron dos péptidos antimicrobianos de lisozima de clara de huevo de gallina mediante digestión con pepsina y tripsina, IVSDGDMNAW y HGLDNYR, con actividad frente a *E. coli* K-12 y *Staphylococcus aureus* 23-394.

En el trabajo realizado por Tang *et al.* (2013) encontraron actividad antimicrobiana en distintos hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos con pepsina, tripsina y papaína a tiempos de hidrólisis determinados, ya que la misma enzima, según el tiempo que se le dejara actuar sobre el sustrato, podía dar lugar a péptidos, que en lugar de inhibir, potenciaban el crecimiento del microorganismo. En este mismo estudio, en el caso de los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos con *Flavourzyme*[®], neutrasa y alcalasa, a cualquiera de los distintos tiempos de hidrólisis ensayados (1, 2, 3, 4 y 5 horas) se promovió el crecimiento de *E. coli*, lo que podría indicar que el tiempo de hidrólisis, que repercute en el grado de escisión de la cadena peptídica, o la especificidad en la hidrólisis de determinadas enzimas, puede proveer al hidrolizado de nutrientes que favorezcan el crecimiento del microorganismo.

IV.6. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA Y OVOALBÚMINA ELABORADOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L.

En este apartado se realiza la comparación entre composición (NNP y perfil cromatográfico) y bioactividad *in vitro*: IECA-I, antioxidante, quelante del hierro (II) y antimicrobiana, de los hidrolizados totales (HT) de caseína bovina y ovoalbúmina al tiempo de hidrólisis de 16 horas, así como de sus fracciones <3kDa. Los hidrolizados se realizaron a las condiciones óptimas de concentración de enzima y sustrato y temperatura de incubación estudiadas para cada una de las proteínas sustrato utilizadas, determinadas mediante el análisis de la cinética enzimática.

IV.6.1. Comparación de la composición en NNP y perfil cromatográfico de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina.

En la Tabla IV.29 y Figura IV.37 se muestran las concentraciones de NNP de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina de dieciséis horas totales y sus fracciones <3kDa.

El tipo de sustrato y el peso molecular influyeron de manera significativa en la producción enzimática de NNP ($P < 0,01$ y $P = 0,01$, respectivamente).

Tabla IV. 29. Efecto del sustrato y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Sustrato		P^1	P^2	P^3
		Caseína (n=3)	Ovoalbúmina (n=3)			
NNP (mg/mL)	HT	4,28 ± 0,31 _a	3,21 ± 0,10 _b	0,01	<0,01	≤0,05
	<3kDa	2,24 ± 0,22 _c	2,08 ± 0,04 _c			

ANOVA: P^1 : efecto del sustrato enzimático; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción del sustrato enzimático con el peso molecular.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Atendiendo al tipo de sustrato, la hidrólisis enzimática con extracto de flor de *C. scolyms* L. de la caseína tras 16 horas de incubación rindió una mayor concentración de NNP que en los hidrolizados de ovoalbúmina, siendo esta

diferencia significativa en el caso de los HT, 4,28 mg/mL y 3,21 mg/mL, respectivamente ($P \leq 0,05$). Sin embargo, si atendemos a la fracción <3kDa, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina (2,24 mg/mL y 2,08 mg/mL, respectivamente). No obstante, los hidrolizados de ovoalbúmina de dieciséis horas tuvieron mayor proporción de péptidos de peso molecular <3kDa que sus homólogos de caseína, como se puede observar en la figura x.

En cuanto al peso molecular de los hidrolizados, éste afectó de manera significativa ($P < 0,01$) a la concentración de NNP de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina, siendo menor dicha concentración en las fracciones de peso molecular <3kDa respecto a sus hidrolizados totales ($P \leq 0,05$).

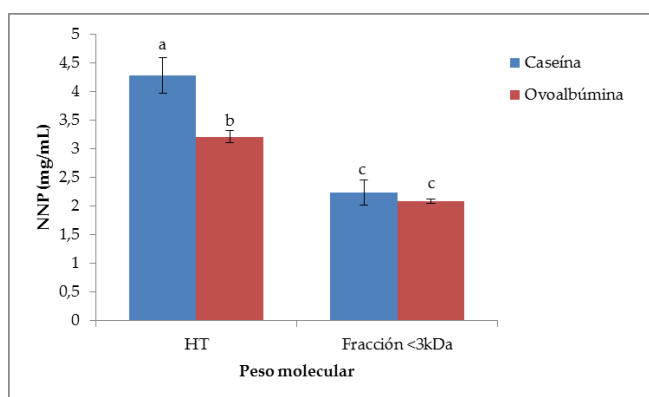


Figura IV. 37. Efecto del sustrato y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Por otro lado, en la Tabla IV.30 se muestra las concentraciones de péptidos totales así como las concentraciones de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos y su ratio de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina expresadas en unidades de área cromatográfica (u.a.c.) por μg de NNP de los hidrolizados.

El tipo de sustrato afectó de manera significativa ($P \leq 0,001$) en el área total cromatográfica de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina. A pesar de que en los hidrolizados totales no hubo apenas diferencias en la concentración total en unidades de área cromatográfica entre la caseína y la ovoalbúmina ($P > 0,05$), sí se

evidenciaron diferencias estadísticamente significativas respecto al área total de sus fracciones <3kDa, siendo mayor dicha concentración para la caseína ($P \leq 0,05$). Por otro lado, el área total cromatográfica por μg de NNP fue mayor en los hidrolizados totales respecto a las fracciones <3kDa de ambos hidrolizados ($P \leq 0,05$).

Tabla IV. 30. Efecto del tipo de sustrato y el peso molecular en la concentración de péptidos totales, hidrofílicos e hidrofóbicos (u.a.c./ μg NNP) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Sustrato		P^1	P^2	P^3
		Caseína (n=3)	Ovoalbúmina (n=3)			
Total/ μg	HT	$195,75 \cdot 10^4 \pm 8,2 \cdot 10^4_a$	$203,59 \cdot 10^4 \pm 11,7 \cdot 10^4_a$	0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	$130,05 \cdot 10^4 \pm 8,6 \cdot 10^4_b$	$61,74 \cdot 10^4 \pm 6,9 \cdot 10^4_c$			
HI/ μg	HT	$18,52 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4_a$	$51,15 \cdot 10^4 \pm 8,5 \cdot 10^4_c$	<0,01	>0,05	<0,05
	<3kDa	$26,91 \cdot 10^4 \pm 0,9 \cdot 10^4_b$	$31,31 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4_b$			
HO/ μg	HT	$177,23 \cdot 10^4 \pm 9,1 \cdot 10^4_a$	$152,44 \cdot 10^4 \pm 20,2 \cdot 10^4_a$	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$103,14 \cdot 10^4 \pm 9,2 \cdot 10^4_b$	$30,43 \cdot 10^4 \pm 5,4 \cdot 10^4_c$			
HO/HI	HT	$10,40 \pm 2,5_a$	$3,30 \pm 1,0_b$	<0,01	0,01	>0,05
	<3kDa	$3,86 \pm 0,4_b$	$0,96 \pm 0,1_b$			

(Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : efecto del sustrato enzimático; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción del sustrato enzimático con el peso molecular.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

La concentración en péptidos hidrofílicos se vio afectada de manera significativa por el tipo de sustrato enzimático ($P < 0,01$). El hidrolizado de ovoalbúmina total presentó mayor concentración de péptidos hidrofílicos que su homólogo de caseína ($P \leq 0,05$). Para la fracción <3kDa no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Por otra parte, considerando los valores promedios del conjunto de los hidrolizados, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en la concentración de péptidos

hidrofílicos entre los hidrolizados totales y sus fracciones <3kDa. Sin embargo, para ambos sustratos la fracción <3kDa presentó menor concentración que su total ($P \leq 0,05$).

El sustrato enzimático influyó de manera significativa ($P < 0,01$) en la concentración de péptidos hidrofóbicos de los hidrolizados. Aunque no se evidenciaron diferencias significativas entre los hidrolizados totales ($P > 0,05$), la fracción <3kDa del hidrolizado de caseína presentó mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que su análoga a partir de ovoalbúmina. Los hidrolizados totales presentaron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos por μg de NNP que sus fracciones <3kDa para ambos sustratos ($P \leq 0,05$).

El ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos se vio afectado de manera significativa ($P < 0,01$) por el tipo de sustrato enzimático, siendo mayor en el hidrolizado de caseína tanto en el caso del hidrolizado total como en su fracción <3kDa ($P \leq 0,05$). El ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos fue mayor en los hidrolizados totales en comparación con sus fracciones <3kDa ($P \leq 0,05$).

Las imágenes de los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas con extracto de flor de alcachofa se muestran en la Figura IV.38. Como se puede observar, el hidrolizado de caseína presentó un mayor número de picos que su análogo de ovoalbúmina. La distribución de los péptidos en el cromatograma también varió. En el hidrolizado de caseína existe una mayor proporción de picos a partir del tiempo de elución de 40 minutos, correspondiéndose al flujo de solvente más apolar. Sin embargo, el perfil cromatográfico del hidrolizado de ovoalbúmina es más homogéneo, llamando la atención un pico de mayor intensidad a los 58 minutos de elución. También se puede observar en el hidrolizado de ovoalbúmina una mayor concentración de picos entre los 0-10 minutos de elución correspondientes a aminoácidos.

Se observan también similitudes en los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de los dos sustratos. Además de los aminoácidos Tyr y Trp que se identificaron en ambos hidrolizados, se presentaron algunos picos comunes como por ejemplo los aparecidos a los tiempos de elución de 47, 58 y 68 minutos.

Las fracciones <3kDa presentaron picos de menor intensidad en ambos casos.

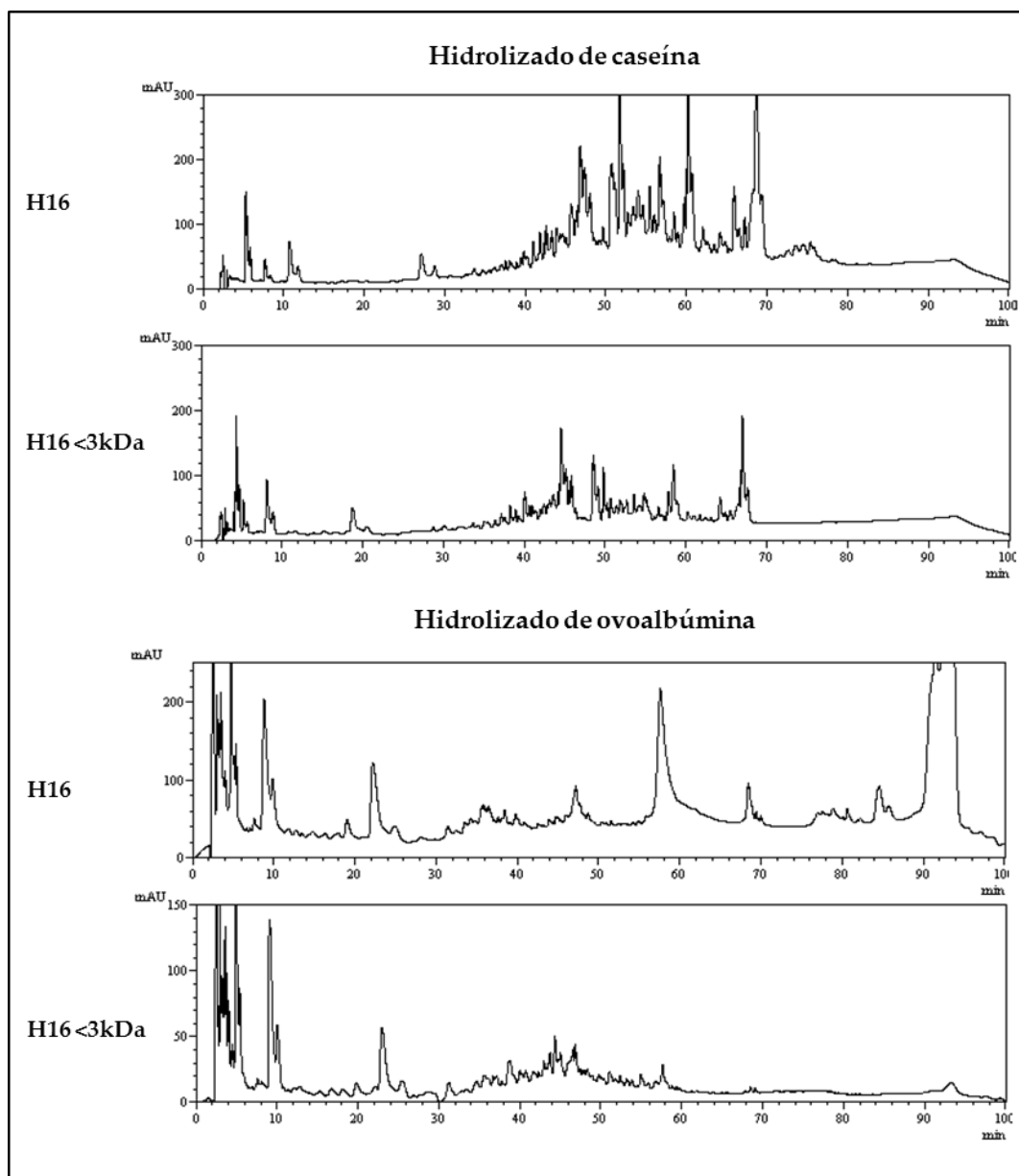


Figura IV. 38. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas de hidrólisis con extracto de flor de *C. scolymus* L.

IV.6.2. Comparación de la actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina.

En la Tabla IV.31 y Figura IV.39 se muestran los porcentajes e IC_{50} de actividad IECA-I de los hidrolizados totales de caseína y ovoalbúmina de 16 horas de tiempo de hidrólisis, así como de sus fracciones de peso molecular $<3kDa$.

El tipo de proteína utilizada como sustrato enzimático afectó de manera significativa a la actividad IECA-I de los hidrolizados con proteasas de extracto de flor de *C. scolyms* L a partir de caseína y ovoalbúmina ($P<0,01$). Los hidrolizados (totales y fracción $<3kDa$) de ovoalbúmina mostraron mayor actividad IECA-I que sus homólogos de caseína: 86,78 y 89,87% vs. 69,55 y 64,06%, respectivamente ($P\leq 0,05$).

El peso molecular no influyó de manera significativa ($P>0,05$) en la actividad IECA-I de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de 16 horas de tiempo de hidrólisis.

Tabla IV. 31. Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tamaño molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de caseína y ovoalbúmina. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Sustrato		P^1	P^2	P^3
		Caseína (n=3)	Ovoalbúmina (n=3)			
% IECA	HT	55,05 ± 3,69 _a	86,78 ± 1,75 _b	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	61,91 ± 3,22 _a	89,87 ± 0,21 _b			
IECA (IC_{50} : µg/mL)	HT	114,21 ± 9,95 _a	69,55 ± 3,12 _c	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	87,86 ± 11,06 _b	64,06 ± 0,37 _c			

ANOVA: P^1 : efecto del sustrato enzimático; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción del sustrato enzimático con el peso molecular.

a,b: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P\leq 0,05$).

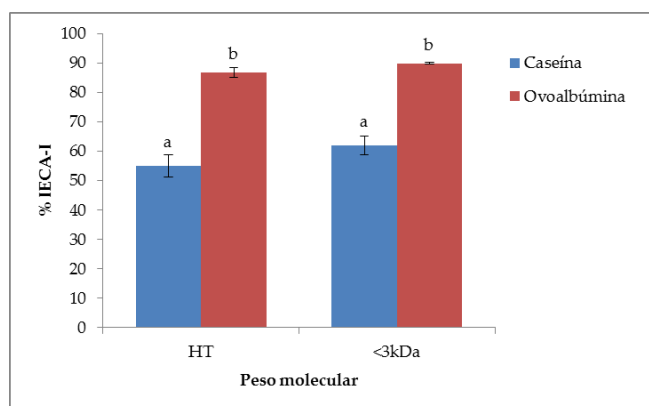


Figura IV. 39. Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tamaño molecular en la actividad IECA de hidrolizados de caseína y ovoalbúmina. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

IV.6.3. Comparación de la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína bovina y ovoalbúmina.

En la Tabla IV.32 y Figura IV.40, se presentan la actividad antioxidante frente a los radicales libres DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolyimus* L. de dieciséis horas de tiempo de hidrólisis.

El tipo de sustrato enzimático influyó de forma significativa en la actividad captadora del radical DPPH ($P < 0,01$). Los hidrolizados de ovoalbúmina totales y sus fracciones <3kDa mostraron mayor actividad respecto a los hidrolizados de caseína ($P \leq 0,05$), siendo el valor de TEAC de la fracción <3kDa del hidrolizado de ovoalbúmina más de tres veces mayor que el de su análogo a partir de caseína. Por otro lado, el peso molecular afectó de manera significativa en la actividad antioxidante frente al DPPH• ($P < 0,01$), siendo más potente dicha actividad en las fracciones de peso molecular <3kDa.

La actividad de captación del radical de ABTS no se vio prácticamente afectada por el tipo de sustrato enzimático, observándose un valor de P entre 0,05 y 0,07. Únicamente se observó un incremento estadísticamente significativo en la fracción <3kDa del hidrolizado de caseína respecto a la fracción <3kDa del hidrolizado de ovoalbúmina ($P \leq 0,05$): 6,21 mM Eq Trolox/mg vs. 4,30 mM Eq

Trolox/mg, respectivamente. Por otra parte, el peso molecular no afectó a la actividad antioxidante de los hidrolizados frente al ABTS^{•+} ($P>0,05$).

Tabla IV. 32. Efecto del sustrato enzimático y el peso molecular de los hidrolizados de ovoalbúmina y caseína en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH[•] y ABTS^{•+}, y actividad quelante del Fe²⁺. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Sustrato		P ¹	P ²	P ³
		Caseína (n=3)	Ovoalbúmina (n=3)			
%RSA DPPH	HT	30,89 ± 5,47 _a	72,51 ± 0,33 _b	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	25,67 ± 4,82 _a	74,09 ± 0,40 _b			
TEAC DPPH (μM Eq Trolox/mg)	HT	4,35 ± 0,72 _a	13,03 ± 0,44 _b	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	6,27 ± 1,06 _a	20,53 ± 0,50 _c			
RSA ABTS ^{•+} (IC ₅₀ : μg/mL)	HT	6,65 ± 0,55 _{ab}	6,92 ± 0,14 _b	0,07	>0,05	>0,05
	<3kDa	4,61 ± 0,10 _a	6,65 ± 0,04 _{ab}			
TEAC ABTS ^{•+} (mM Eq Trolox/mg)	HT	4,36 ± 0,34 _a	4,13 ± 0,09 _a	0,05	>0,05	>0,05
	<3kDa	6,21 ± 0,13 _b	4,30 ± 0,03 _a			
Quelante Fe ²⁺ (IC ₅₀ : μg/mL)	HT	337,09 ± 4,89 _a	51,03 ± 2,11 _b	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	221,49 ± 18,29 _a	54,00 ± 0,94 _b			

ANOVA: P¹: efecto del sustrato enzimático; P²: efecto del peso molecular; P³: efecto de la interacción del sustrato enzimático con el peso molecular.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P\leq 0,05$).

El tipo de sustrato enzimático influyó de manera significativa en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados ($P<0,01$). La hidrólisis de ovoalbúmina rindió unos valores de IC₅₀ mucho más bajos (indicando mayor actividad) que los observados a partir de la hidrólisis de la caseína: 54,00 μg/mL vs. 221,49 μg/mL ($P\leq 0,05$). Por otro lado, el peso molecular no influyó en la actividad quelante de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas de tiempo de hidrólisis ($P>0,05$).

A la vista de estos resultados podemos afirmar que en general, los hidrolizados de ovoalbúmina elaborados con proteasas de extracto de flor de alcachofa a las dieciséis horas de tiempo de hidrólisis mostraron una mayor actividad antioxidante y quelante del hierro (II) que los obtenidos utilizando

caseína bovina como sustrato enzimático. Así, se demuestra que la actividad antioxidante de los hidrolizados además de depender de la proteasa y las condiciones de hidrólisis empleadas, también se ve afectada por el tipo de proteína utilizada como sustrato enzimático (Sampath-Kumar, 2011).

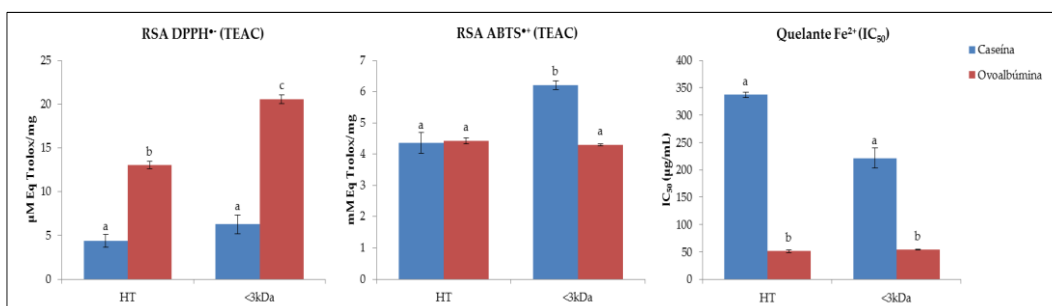


Figura IV. 40. Efecto del sustrato enzimático y el peso molecular de los hidrolizados de ovoalbúmina y caseína en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del Fe²⁺. (Valores de medias y barras de error estándar).

IV.6.4. Comparación de la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina.

El hidrolizado de caseína de dieciséis horas de hidrólisis mostró un efecto inhibitorio del crecimiento sobre el microorganismo Gram negativo *E. faecalis* alargando la fase Lag ($P \leq 0,01$) y disminuyendo su crecimiento máximo ($P \leq 0,01$) respecto a las curvas control. Dicho efecto fue mayor con el hidrolizado total. Sin embargo, no se observó efecto inhibitorio sobre *E. coli*. Por otro lado, el hidrolizado de caseína no tuvo efecto inhibitorio en el crecimiento de los microorganismos Gram positivos testados *L. innocua* y *P. fluorescens*.

Respecto al hidrolizado de ovoalbúmina de dieciséis horas de hidrólisis, únicamente la fracción <3kDa modificó la velocidad de crecimiento de *E. faecalis* ($P \leq 0,01$), sin observarse variación en el crecimiento final respecto a las curvas de crecimiento control. Tampoco se observó efecto antimicrobiano frente *E. coli*. Igualmente, el hidrolizado de ovoalbúmina no presentó actividad inhibidora del crecimiento sobre los microorganismos Gram positivos evaluados.

En general los hidrolizados de caseína presentaron mayor actividad frente a *E. faecalis* que los obtenidos a partir de ovoalbúmina. Por otra parte, ninguno de los dos hidrolizados presentó actividad antimicrobiana frente a los microorganismos Gram positivos (*L. innocua* y *P. fluorescens*) testados.

IV.7. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE LECHE DE VACA DE ALTA PASTEURIZACIÓN OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L. Y CUAJO ANIMAL.

En este apartado se incluyen los resultados de la caracterización y bioactividad de los dos hidrolizados de leche de vaca entera comercial de alta pasteurización, obtenidos a partir con extracto de flor de alcachofa (HLV EA) y cuajo animal comercial (quimosina y pepsina) (HLV CA), al tiempo de hidrólisis de dieciséis horas. Además, para cada hidrolizado, se obtuvieron mediante ultrafiltración, las fracciones de peso molecular <3kDa.

IV.7.1. Concentración en NNP de los hidrolizados de leche de vaca.

Estimar la intensidad de la hidrólisis, la cantidad de péptidos producidos, así como la fracción de los mismos con bajo peso molecular es importante, ya que estos péptidos de cadena corta tienen generalmente mejor actividad antihipertensiva y antioxidante que los de cadena larga (Contreras *et al.*, 2009; Di Pierro *et al.*, 2014), y además, también tienen mejor resistencia a la degradación por las enzimas digestivas (Cinq-Mars *et al.*, 2008). El grado final de hidrólisis depende principalmente de la enzima empleada, su concentración y el tiempo de reacción (Espejo-Carpio *et al.*, 2016).

En la Tabla IV.33 se muestra la concentración de NNP de los hidrolizados de leche de vaca totales (HT) y sus fracciones <3kDa.

El tipo de enzima utilizado en la hidrólisis influyó de manera significativa en la concentración de NNP de los hidrolizados ($P < 0,01$). Los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor concentración de NNP (7,81 mg/mL), que los obtenidos a partir de cuajo animal comercial (2,92 mg/mL) ($P \leq 0,05$). Lo mismo ocurrió si nos referimos a las fracciones <3kDa, con una concentración de 3,53 mg/mL de NNP para la fracción <3kDa del hidrolizado con enzima vegetal y de 2,30 mg/mL para la fracción <3kDa del hidrolizado preparado con cuajo animal ($P \leq 0,05$).

Las fracciones de peso molecular <3kDa presentaron menor concentración de NNP que sus hidrolizados totales ($P \leq 0,05$).

Tabla IV. 33. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
NNP (mg·mL ⁻¹)	HT	7,81 ± 0,11 _a	2,92 ± 0,05 _c	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	3,53 ± 0,07 _b	2,30 ± 0,20 _d			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

No se han encontrado apenas publicaciones con información sobre la concentración en NNP o peptídica de hidrolizados de leche de vaca. Respecto a la utilización de enzimas de origen vegetal, Corrons *et al.* (2012) utilizaron las proteasas de un extracto de látex de *Maclura pomifera* como coagulante de leche de vaca para la obtención de suero, consiguiendo una concentración de 11,7 mg/mL de proteína en el suero total, y de 2,7 mg/mL para la fracción <5kDa. En un trabajo publicado este mismo año (Corrons *et al.*, 2017) se describe la utilización de las proteasas de *M. pomifera* en la hidrólisis de caseína bovina, indicando una concentración en la fracción <3kDa de péptidos de 1,8 mg/mL tras tres horas de hidrólisis. Por otro lado, respecto a la utilización de enzimas de origen animal, Tagliazucchi *et al.* (2016a) realizaron la digestión gastro-pancreática de leche bovina obteniendo al final del proceso un fracción >3kDa con 4,9 mg/mL de masa molecular y otra <3kDa con 10,6 mg/mL, recuperando de esta manera el 68,4% de la proteína sujeta a hidrólisis en la fracción <3kDa. Este resultado es similar al obtenido en el caso del HLV CA, donde la fracción <3kDa supuso un 78,77% del NNP total. Por último, en la digestión *in vitro* gastrointestinal de leche de camello, se obtuvo una fracción <3kDa con una concentración peptídica de 21,74 mg/mL (Tagliazucchi *et al.* 2016b), siendo esta concentración considerablemente mayor a la observada en las fracciones <3kDa de nuestros hidrolizados de leche de vaca.

IV.7.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de leche de vaca.

En la Tabla IV.34 se muestra el efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la cantidad de péptidos totales, hidrófobos e hidrófilos de los hidrolizados de leche de vaca, expresados como unidades de área cromatográfica (u.a.c.) por μg de NNP de hidrolizado. Los perfiles cromatográficos de los hidrolizados se muestran en la Figura IV.41.

Tabla IV. 34. Efecto del tipo de enzima en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de leche de vaca expresada en unidades de área cromatográfica $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Total/ μg	HT	$182,05 \cdot 10^4 \pm 9,36 \cdot 10^4$ _a	$80,72 \cdot 10^4 \pm 12,55 \cdot 10^4$ _b	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$85,51 \cdot 10^4 \pm 9,23 \cdot 10^4$ _b	$9,57 \cdot 10^4 \pm 1,71 \cdot 10^4$ _c			
HI/ μg	HT	$9,07 \cdot 10^4 \pm 1,03 \cdot 10^4$ _a	$6,85 \cdot 10^4 \pm 0,75 \cdot 10^4$ _a	<0,01	<0,05	<0,05
	<3kDa	$18,41 \cdot 10^4 \pm 2,74 \cdot 10^4$ _b	$7,28 \cdot 10^4 \pm 0,99 \cdot 10^4$ _a			
HO/ μg	HT	$172,98 \cdot 10^4 \pm 8,46 \cdot 10^4$ _a	$73,87 \cdot 10^4 \pm 11,97 \cdot 10^4$ _b	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$67,11 \cdot 10^4 \pm 7,17 \cdot 10^4$ _b	$2,29 \cdot 10^4 \pm 0,75 \cdot 10^4$ _c			
HO/HI	HT	$19,38 \pm 1,47$ _a	$10,73 \pm 1,08$ _b	<0,01	<0,01	<0,05
	<3kDa	$3,72 \pm 0,42$ _c	$0,30 \pm 0,07$ _d			

(Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

La enzima utilizada en la hidrólisis de la leche afectó de manera significativa a la concentración de área total cromatográfica por μg de NNP de los hidrolizados ($P < 0,01$). Así, el hidrolizado elaborado con proteasas de flor de alcachofa tuvo mayor concentración de péptidos, en cuanto unidades de área total cromatográfica se refiere ($182,05 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP), que el hidrolizado preparado con cuajo animal ($80,72 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP) ($P \leq 0,05$).

La concentración de péptidos totales fue significativamente mayor ($P<0,01$) que la de la fracción $<3\text{kDa}$ ($P\leq 0,05$).

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa a la concentración de péptidos hidrófilos presentes en los hidrolizados ($P<0,01$), siendo mayor dicha concentración para los hidrolizados preparados con enzima vegetal ($P\leq 0,05$). El hidrolizado con extracto de flor de alcachofa presentó una media de $9,07 \cdot 10^4$ u.a.c. correspondiente a péptidos hidrófilos por μg de NNP, y su análogo con cuajo animal de $6,85 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP.

El peso molecular también afectó de manera significativa en la concentración de péptidos hidrofílicos de las muestras ($P<0,05$), presentando la fracción $<3\text{kDa}$ mayor concentración de péptidos hidrófilos que el hidrolizado total en los dos tipos de hidrolizados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P\leq 0,05$) en el caso del hidrolizado con enzima vegetal. La mayor concentración de péptidos hidrofílicos en las fracciones $<3\text{kDa}$ puede ser debido a que el peso molecular afecta al tiempo de elución de los péptidos, apareciendo los péptidos pequeños a menor tiempo de elución (De Gobba *et al.*, 2014b) y considerándose de esta manera hidrofílicos.

La concentración de péptidos hidrofóbicos de las muestras también se vio afectada de manera significativa ($P<0,01$) por el tipo de enzima utilizado. El hidrolizado total de leche de vaca elaborado con extracto de flor de alcachofa presentó una media de 2,3 veces más concentración de péptidos hidrofóbicos que los hidrolizados preparados con cuajo animal ($P\leq 0,05$) ($172,98 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP *vs.* $73,87 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP). En el caso de sus fracciones $<3\text{kDa}$ la diferencia fue todavía mayor, presentando el hidrolizado con enzima vegetal 29 veces más concentración de péptidos hidrofóbicos que su análogo con cuajo animal ($P\leq 0,05$) ($67,11 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP *vs.* $2,29 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP).

El peso molecular de los péptidos también influyó de forma significativa en la concentración de péptidos hidrofóbicos ($P<0,01$), siendo menor dicha concentración tanto en la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado preparado con enzima vegetal como en la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado con cuajo animal ($P\leq 0,05$). Esto puede ser debido, como se ha comentado, a que el peso molecular influye en el tiempo de elución de los péptidos (De Gobba *et al.*, 2014b).

El ratio de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos también se vio afectado de manera significativa por el tipo de enzimas utilizado ($P<0,01$). El hidrolizado de

leche de vaca obtenido con enzima vegetal presentó un mayor ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos, 19,38, que el hidrolizado preparado con cuajo animal, 10,73, ($P \leq 0,05$). Lo mismo ocurrió si nos referimos a sus fracciones <3kDa, donde la fracción <3kDa del hidrolizado con enzima vegetal presentó un ratio de 3,72 frente al de 0,30 de la fracción <3kDa del hidrolizado con cuajo animal.

El peso molecular también afectó de manera significativa al ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos de las muestras ($P < 0,01$), siendo menor dicho ratio en las fracciones de peso molecular <3kDa respecto a sus hidrolizados totales en los dos tipos de hidrolizados ($P \leq 0,05$).

Si atendemos a los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de leche de vaca (Figura IV.41), podemos observar una gran diferencia entre la hidrólisis producida por las proteasas extraídas de flor de *C. scolymus* L. y la obtenida con el cuajo animal comercial. Los hidrolizados elaborados con extracto de flor de alcachofa presentan una proteólisis más intensa con la aparición de un gran número de péptidos concentrados mayormente entre los 40 y 70 minutos de tiempo de elución. En los hidrolizados obtenidos a partir de cuajo animal se observan tres picos principales de gran intensidad a los tiempos de elución de 58, 69 y 80 minutos. Por otra parte, la fracción de peso molecular <3kDa de la muestra con extracto vegetal, presenta una gran cantidad de péptidos y de mayor intensidad que los observados en el cromatograma de la fracción <3kDa de la muestra con cuajo animal, donde únicamente se distinguen cinco picos de baja intensidad.

Los hidrolizados obtenidos con proteasas de extracto de flor de *C. scolymus* L. mostraron mayor número de péptidos que los obtenidos utilizando cuajo animal comercial, así como mayor ratio de péptidos HO/HI. La actividad enzimática de las distintas proteasas podría explicar las diferencias en la producción de péptidos entre los dos tipos de hidrolizados.

Varios autores han estudiado las proteinasas con capacidad coagulante de *Cynara scolymus* (Llorente *et al.*, 2004 y 2014; Sidrach *et al.*, 2005). Sidrach *et al.* (2005) purificaron tres cinarasas (cinarasa A, B y C) de un extracto de flor de alcachofa indicando que las proteasas presentes se unieron a la κ -caseína en el mismo enlace peptídico (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) que la quimosina, sin embargo observaron diferencias en la hidrólisis de la α - y β -caseínas.

Llorente *et al.* (2014) cuando analizaron el perfil hidrolítico en la caseína con las proteasas aspárticas de un extracto de *C. scolymus* observaron que además de la escisión en el enlace de la κ -caseína Phe₁₀₅-Met₁₀₆, las enzimas aisladas mostraron especificidad también por los enlaces Tyr₄₂-Tyr₄₃ y Leu₅₀-Ile₅₁, ambos del extremo N-terminal del péptido hidrofóbico para κ -caseína. Por otra parte, la extensión de la hidrólisis de las caseínas por el extracto de alcachofa es similar a la obtenida con extractos solubles en agua de *C. cardunculus* (Sidrach *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2002). En este sentido, varios autores han estudiado la actividad coagulante de la leche de las proteinasas de *C. cardunculus*, la cardosina A y cardosina B, mostrando una especificidad similar a la quimosina y al pepsina, respectivamente (Faro *et al.* 1999; Ramaho-Santos *et al.*, 1996; Veríssimo *et al.*, 1995). No obstante, cuando se estudió la especificidad de la quimosina y las proteinasas de *C. cardunculus* en la escisión de la α_{s1} -caseína, se demostró que las cinarasas de *C. cardunculus* podían romper más enlaces además de los propios de la quimosina (Macedo *et al.*, 1993). De la misma forma, Macedo *et al.* (1996) observaron que las proteinasas de *C. cardunculus* hidrolizaban enlaces en ciertas áreas altamente hidrofóbicas de la α_{s1} -caseína (Ala₁₆₃-Trp-Tyr-Tyr-Val₁₆₇) y la β -caseína (Ala₁₈₉-Phe-Leu-Leu-Tyr₁₉₃), mientras que la quimosina sólo escinde Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ en esta región de la α_{s1} -caseína y Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ en esta región de la β -caseína, resultando por este hecho la hidrólisis con proteinasas de *C. cardunculus* en una mayor producción de péptidos hidrofóbicos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los trabajos arriba mencionados, podrían explicar el mayor número de péptidos producidos en nuestro hidrolizado con extracto de flor de *C. scolymus* frente al hidrolizado con cuajo animal comercial, así como el mayor ratio de péptidos HO/HI. A este respecto, varios autores corroboran este resultado, evidenciando que el uso de estas enzimas como coagulantes vegetales en la elaboración de quesos da lugar a la formación de mayor cantidad de péptidos hidrofóbicos en comparación con el uso de enzimas de origen animal o microbiano (Agboola *et al.*, 2004; Carrera *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2009; Tejada *et al.*, 2008; Timón *et al.*, 2014). De la misma manera, también se ha descrito que las proteinasas aspárticas de flores de varias especies del género *Cynara*, tienen una elevada acción proteolítica que conduce a la fragmentación intensa de las caseínas (Galán *et al.*, 2008), pudiéndose producir de este modo péptidos pequeños. Esto podría explicar la mayor concentración de

péptidos en las fracciones de bajo peso molecular de los hidrolizados con extracto de alcachofa respecto a sus análogos de hidrolizado con cuajo animal.

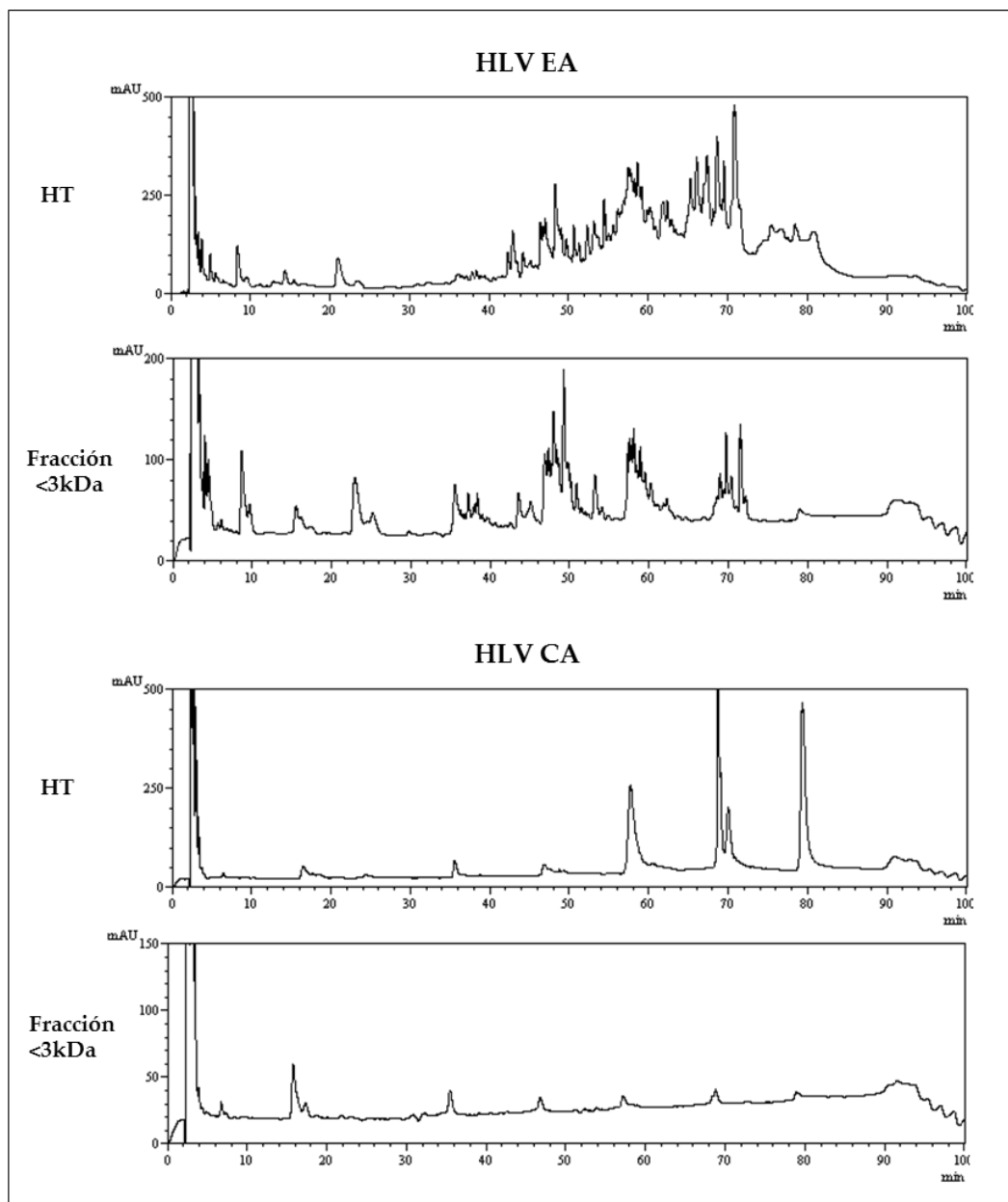


Figura IV. 41. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de leche de vaca preparados con proteasas de extracto de flor de alcachofa (HLV EA) y cuajo animal (HLV CA).

IV.7.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca.

En la Tabla IV.35 y la Figura IV.42, se muestra la actividad IECA de los hidrolizados de leche de vaca totales así como la de sus fracciones <3kDa, elaborados con proteasas de extracto de flor de *C. scolyms* L. y con cuajo animal comercial.

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa ($P < 0,01$) a la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca. La hidrólisis con extracto de flor de alcachofa rindió péptidos con mayor actividad IECA-I ($P \leq 0,05$) que los obtenidos a partir de la hidrólisis con cuajo animal, presentando una inhibición del 47,59% y 5,99%, respectivamente. Lo mismo sucedió si nos referimos a las fracciones de bajo peso molecular, con una actividad IECA del 62,77% para la fracción <3kDa del hidrolizado con enzima vegetal y del 5,62% para la fracción <3kDa del hidrolizado con cuajo animal ($P \leq 0,05$).

Tabla IV. 35. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
IECA %	HT	47,59 ± 4,24 _b	5,99 ± 0,44 _c	<0,01	<0,05	<0,05
	<3kDa	62,77 ± 1,38 _a	5,62 ± 0,31 _c			
IECA (IC ₅₀ : µg/mL)	HT	134,13 ± 12,88 _b	814,00 ± 1,50 _d	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	92,56 ± 1,94 _a	677,39 ± 3,19 _c			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

La mayor actividad IECA-I de los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa, puede ser debida a que estos hidrolizados presentaron una considerable mayor concentración de péptidos hidrofóbicos y mayor ratio HO/HI que los hidrolizados obtenidos con el cuajo animal, siendo los péptidos con residuos hidrofóbicos los que han demostrado mayor actividad IECA (Cheung *et al.*, 1980).

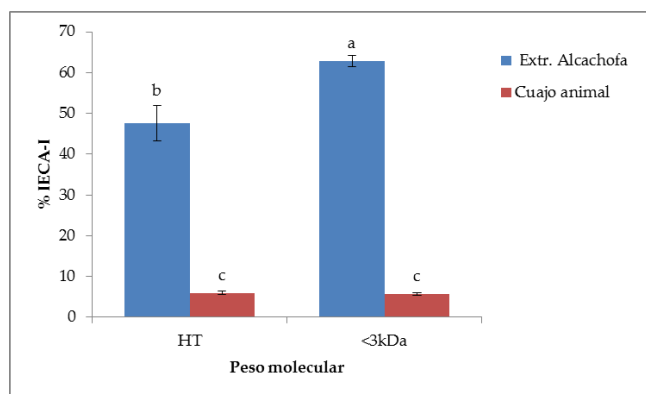


Figura IV. 42. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

No se esperaba la actividad IECA tan baja obtenida con el hidrolizado elaborado con cuajo animal, teniendo la pepsina una amplia especificidad hacia los aminoácidos hidrofóbicos. Sin embargo, Otte *et al.* (2007a) observaron unos resultados similares a los nuestros presentado mayor actividad IECA los hidrolizados elaborados con termolisina y proteinasa K respecto a la mostrada por los hidrolizados con pepsina. De la misma manera, en hidrolizados de leche de búfala desnatada, los hidrolizados con papaína y tripsina, mostraron una mayor inhibición de la ECA ($IC_{50} = 45,2 \mu\text{g/mL}$ y $49,1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) que el hidrolizado con pepsina ($IC_{50} = 98,7 \mu\text{g/mL}$) (Abdel-Hamid *et al.*, 2017). De forma similar, Corrons *et al.* (2012) observaron una actividad IECA del 21% en el suero de leche de vaca producido por la acción de proteasas de extracto de látex de *Maclura pomifera*, no detectando actividad en suero producido a partir de quimosina. Por otro lado, Jrad *et al.* (2014) encontraron una mejor actividad IECA (17%) en sus hidrolizados de proteínas de leche de camello con enzimas digestivas (pepsina y pancreatina) en comparación a la obtenida en nuestras muestras de hidrolizado de leche de vaca con cuajo animal.

El peso molecular de los hidrolizados también afectó de manera significativa a la actividad IECA-I de las muestras ($P < 0,05$). Las fracciones de peso molecular $<3\text{kDa}$ mostraron mayor inhibición de la ECA ($P \leq 0,05$) presentando una menor IC_{50} que la obtenida para los hidrolizados totales: $92,6 \mu\text{g/mL}$ vs. $134,1$

$\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso del hidrolizado con extracto de alcachofa y $677,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ vs. $814,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso del cuajo animal. La mayor actividad IECA de las fracciones $<3\text{kDa}$ de los hidrolizados, puede ser debido a que por el menor tamaño de los péptidos presentes, éstos podrían tener mejor accesibilidad para unirse al sitio activo de la ECA (Natesh *et al.*, 2003).

IV.7.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe^{2+} de los hidrolizados de leche de vaca.

En la Tabla IV.36 y la Figura IV.43, se muestra el efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de leche de vaca obtenidos a partir de extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

Tabla IV. 36. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA DPPH %	HT	$77,49 \pm 0,89_a$	$56,95 \pm 1,52_b$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
	$<3\text{kDa}$	$78,82 \pm 1,37_a$	$17,25 \pm 0,37_c$			
RSA DPPH (Eq μM Trolox/mg)	HT	$5,70 \pm 0,08_c$	$11,21 \pm 0,13_b$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,01$
	$<3\text{kDa}$	$12,83 \pm 0,29_a$	$4,35 \pm 0,32_d$			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d. Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca frente al radical DPPH ($P < 0,01$). Si atendemos al porcentaje de captación del radical, el hidrolizado elaborado con extracto de flor de alcachofa presentó mayor actividad que su análogo con cuajo animal ($P \leq 0,05$). El hidrolizado de vaca preparado con proteinasas de *C. scolymus* L. presentó un porcentaje medio de captación del DPPH• de un $77,49\%$, y su fracción $<3\text{kDa}$ de un $78,82\%$, frente al $56,95\%$ de las muestras hidrolizadas con cuajo animal y $17,25\%$ para su fracción $<3\text{kDa}$. Si atendemos al TEAC (actividad

equivalente al Trolox de los hidrolizados por mg de péptidos), la muestra que presentó mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH• fue la correspondiente a la fracción <3kDa del hidrolizado de leche de vaca con extracto de flor de alcachofa con un valor de 12,83 $\mu\text{M Eq Trolox/mg}$ ($P \leq 0,05$).

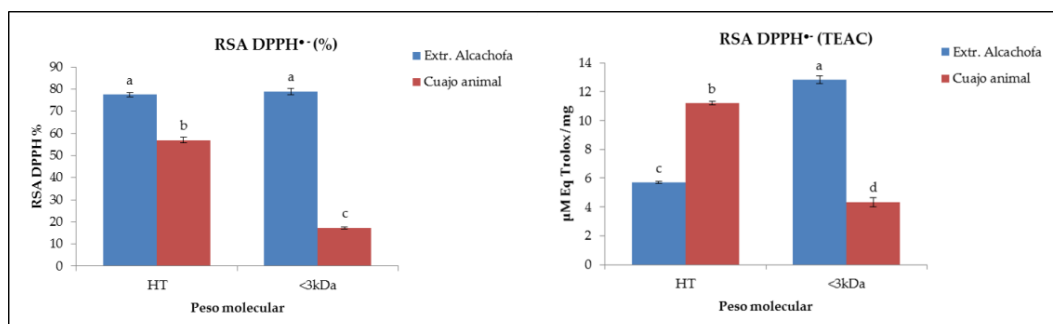


Figura IV. 43. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En general podemos decir que el hidrolizado de leche de vaca con extracto de flor de *C. scolymus* presentó mayor actividad antioxidante frente al radical de DPPH que el hidrolizado con cuajo animal. En este sentido, es de esperar que diferentes hidrolizados enzimáticos posean capacidades antioxidantes distintas.

De la misma manera, Timón *et al.* (2014) a partir de extractos obtenidos de quesos de Burgos de tres días de maduración, observaron que dichos extractos obtenidos de quesos preparados con cuajo animal presentaron menor inhibición del radical DPPH, que los extractos de quesos hechos con coagulante vegetal (*C. cardunculus*) o coagulante microbiano. Así, Corrons *et al.*, (2012) indicaron que el valor de actividad antioxidante frente al DPPH• del suero obtenido a partir de la hidrólisis de leche con pomiferina (*M. pomifera*), 31,6%, fue mayor que el conseguido con el suero preparado con quimosina, 13,2%. También Mao *et al.* (2011) observaron que el efecto antioxidante frente al radical DPPH de los hidrolizado a partir de caseína de leche de yak preparados con papaína fue mayor ($\approx 70\%$) que el obtenido con hidrolizados con pepsina ($\approx 60\%$) ($P < 0,05$), siendo estos porcentajes de inhibición del mismo orden que los obtenidos con nuestros hidrolizados de leche de vaca con proteinasas de *C. scolymus* L. y cuajo animal,

respectivamente. Finalmente, Irshad *et al.* (2013) obtuvieron una mayor captación del radical libre DPPH con el hidrolizado de caseína bovina preparado con tripsina que usando una combinación de pepsina y tripsina.

Si consideramos el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado, se puede observar que el peso molecular de los péptidos afectó de manera significativa en la captación del radical DPPH ($P < 0,01$), siendo mayor la inhibición del radical por parte de los hidrolizados totales ($P \leq 0,05$). Esta diferencia se debe a la influencia de la concentración peptídica de los hidrolizados, siendo mayor la concentración de péptidos en los hidrolizados totales respecto a sus fracciones $< 3\text{kDa}$, ya que se ha demostrado que la inhibición del radical de DPPH es dosis dependiente (Mao *et al.*, 2011; Timón *et al.*, 2014). Sin embargo, si atendemos al TEAC, dicha diferencia de forma general no fue significativa ($P > 0,05$), aunque la fracción $< 3\text{kDa}$ del hidrolizado con extracto de alcachofa presentó mayor TEAC (indicando mayor actividad) ($P \leq 0,05$) que su total, $12,83 \mu\text{M Eq Trolox/mg}$ y $5,70 \mu\text{M Eq Trolox/mg}$, respectivamente. Sin embargo, en el caso del hidrolizado con cuajo animal el hidrolizado total presentó un valor más alto de TEAC ($11,21 \mu\text{M Eq Trolox/mg}$) que su fracción $< 3\text{kDa}$ ($4,35 \mu\text{M Eq Trolox/mg}$).

En el caso del hidrolizado preparado con cuajo animal parece que la actividad antioxidante de los hidrolizados podría depender de la actividad conjunta de todos los péptidos del hidrolizado (Timón *et al.*, 2014). Sin embargo, en el caso de los hidrolizados con enzima vegetal se demuestra la relación entre la capacidad antioxidante y la concentración de péptidos de bajo peso molecular ($< 3\text{kDa}$), al igual que lo observado en otros estudios sobre las propiedades de los antioxidantes de los péptidos (Irshad *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2007; Timón *et al.*, 2014).

En la Tabla IV.37 y Figura IV.44, se muestran el efecto del tipo de enzima utilizado y el peso molecular en la captación del radical de ABTS de los hidrolizados de leche de vaca elaborados con extracto de flor de *C. scolyimus* L. y por otro lado, con cuajo animal comercial.

El tipo de enzima afectó de manera significativa en la captación del radical de ABTS de los hidrolizados de leche de vaca ($P < 0,01$). Así, los hidrolizados elaborados con proteasas de flor de *C. scolyimus* L. dieron un valor de IC_{50} mucho menor (indicando mayor actividad) que el observado para los hidrolizados

preparados con cuajo animal: 8,46 µg/mL y 73,48 µg/mL, respectivamente. Precisamente los hidrolizados con extracto de alcachofa presentaron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que los obtenidos con el cuajo animal comercial, habiéndose descrito que los aminoácidos hidrofóbicos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, pueden aumentar la captación de radicales libres (Rajapakse *et al.*, 2005).

Tabla IV. 37. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca frente al radical ABTS•+. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P ¹	P ²	P ³
		Extr. alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA ABTS•+ (IC ₅₀ : µg/mL)	HT	8,46 ± 0,11 _a	73,48 ± 3,27 _b	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	9,00 ± 0,65 _a	126,81 ± 3,32 _c			
RSA ABTS•+ (Eq mM Trolox/mg)	HT	3,38 ± 0,04 _a	0,39 ± 0,02 _b	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	3,31 ± 0,24 _a	0,23 ± 0,01 _b			

ANOVA: P¹: efecto del tipo de enzima; P²: efecto del peso molecular; P³: efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

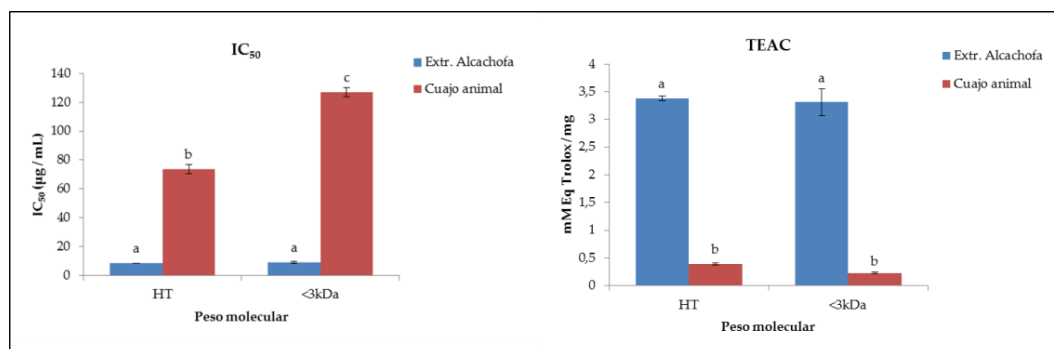


Figura IV. 44. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca frente al radical ABTS•+. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas (P≤0,05)).

Nuestros resultados están en concordancia con los descritos por otros autores. Así, Abdel-Hamid *et al.* (2017) a partir de leche de búfala, observaron una mayor captación del radical libre ABTS•+ por parte de los hidrolizados con

papaína (IC₅₀: 30,5 µg/mL) respecto a los obtenidos con pepsina (IC₅₀: 38,9µg/mL). Por otro lado, Ha *et al.* (2015) encontraron un 69% de inhibición del ABTS•⁺ para el hidrolizado de 24 horas a partir de leche desnatada en polvo con papaína.

El peso molecular de los hidrolizados influyó de manera significativa en el valor de IC₅₀ de actividad antioxidante frente al radical ABTS•⁺ ($P < 0,01$). Esta diferencia se hizo evidente en el caso del hidrolizado con cuajo animal ($P \leq 0,05$), que dio un valor de IC₅₀ de 73,48 µg/mL, y de 126,81 µg/mL para su fracción <3kDa. No se apreció, no obstante una diferencia significativa ($P > 0,05$) entre el valor de IC₅₀ del hidrolizado total con extracto de alcachofa (8,46 µg/mL) y su fracción <3kDa (9,00 µg/mL), evidenciándose en este caso que los péptidos de peso molecular >3kDa también tienen una potente acción de captación del radical ABTS•⁺. Así, Tagliazucchi *et al.* (2016a) en hidrolizados de leche de vaca a partir de su digestión *in vitro*, indicaron que la mayor contribución a la actividad antioxidante de los hidrolizados frente el ABTS•⁺ fue la de la fracción >3kDa.

Por otra parte, De Gobba *et al.* (2014a) observaron que los hidrolizados preparados a partir de leche y el retenido de su filtrado presentaron mucha mayor captación del radical ABTS•⁺ que la hidrólisis a partir de su permeado, concluyendo que las caseínas (presentes en la leche y el retenido, pero no en el permeado) juegan un importante papel en la captación de radicales libres. Así también Chen *et al.* (2003) atribuyó a la caseína una gran actividad frente el ABTS•⁺, afirmando también que en la leche muchos otros componentes son activos, contribuyendo los lípidos de manera importante en la actividad captadora de radicales libres.

En referencia a la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca elaborados con proteasas de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal, en la Tabla IV.38 y Figura IV.45, se muestran el efecto del tipo de hidrolizado y el peso molecular en los valores de IC₅₀ obtenidos para los hidrolizados y sus fracciones <3kDa.

El tipo de enzima afectó de manera significativa en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca ($P < 0,01$). Las muestras de hidrolizados preparadas con extracto de flor de alcachofa presentaron un valor de IC₅₀ mayor (indicando menor potencia quelante) que los hidrolizados preparados con cuajo animal. Esta diferencia se constata entre los valores de IC₅₀ de las

fracciones de bajo peso molecular ($P \leq 0,05$), con un valor de 16,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso de la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado con proteasas vegetales y de 10,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado con cuajo animal. De Gobba *et al.* (2014a) observaron que el grado de hidrólisis tenía una correlación negativa con la actividad quelante del hierro en los hidrolizados de leche de cabra, lo que podría justificar que nuestros hidrolizados con enzima vegetal, con mayor grado de hidrólisis que los hidrolizados con cuajo animal, presenten menor capacidad quelante del Fe^{2+} . De la misma manera, Hogan *et al.* (2009) indicaron que de las fracciones estudiadas de sus hidrolizados de proteína de leche con enzimas microbianas, las más hidrolizadas presentaron una capacidad quelante del hierro más débil. Al contrario, Timón *et al.* (2014) indicaron que los extractos de queso de Burgos elaborados con cuajo animal tendieron a presentar menor porcentaje de actividad quelante que los obtenidos a partir de coagulante de *C. cardunculus*.

Tabla IV. 38. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Quelante Fe^{2+} (IC_{50} : $\mu\text{g}/\text{mL}$)	HT	13,60 \pm 0,16 _a	12,73 \pm 1,11 _a	<0,01	>0,05	<0,05
	<3kDa	16,95 \pm 1,27 _b	10,90 \pm 0,14 _a			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

^{a,b}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Por otro lado, el peso molecular de nuestros hidrolizados de leche de vaca no influyó de manera significativa en la actividad quelante del hierro (II) ($P > 0,05$). Por el contrario, De Gobba *et al.* (2014a) observaron que las sustancias no proteicas de bajo peso molecular, tales como la lactosa, ácidos y sales, podrían ejercer efecto o bien influir en la medición de dicha actividad, siendo responsables en gran medida de la actividad quelante del hierro. De esta forma, De Gobba *et al.* (2014a) hipotetizaron que el grado de hidrólisis puede influir de manera negativa en la actividad quelante, ya que los péptidos, dado que contienen más carga que la proteína original sin hidrolizar, podrían llegar a interaccionar con estos compuestos de bajo peso molecular, impidiendo su reactividad con el hierro.

Nuestros hidrolizados, demostraron mucha más actividad quelante del hierro (II) en comparación con los hidrolizados de proteína de leche bovina reportados por Conway *et al.* (2012), de los cuales el de mayor potencia quelante del hierro correspondió a un hidrolizado peptídico de leche desnatada con un valor de IC_{50} ente 1 y 4 mg/mL.

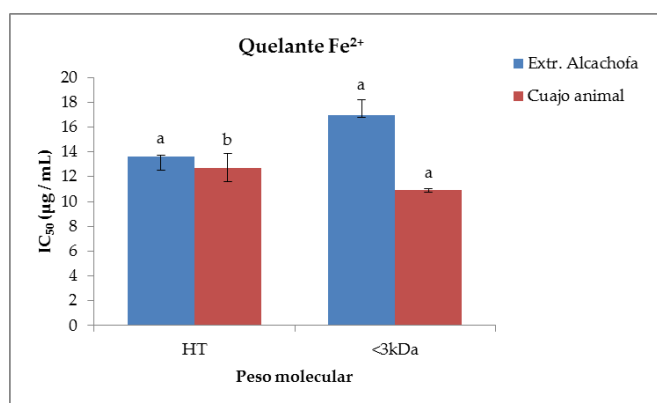


Figura IV. 45. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de vaca. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Los hidrolizados de leche de vaca, tanto con proteinasas de extracto de flor de *C. scolymus* L. como con cuajo animal comercial, como ocurría con los hidrolizados de caseína, presentaron grandes diferencias en su capacidad captadora de radicales libres entre los distintos ensayos de actividad antioxidante. La actividad de los hidrolizados frente al radical DPPH fue sustancialmente menor a la mostrada en la inhibición del radical ABTS, con valores de TEAC de $\mu\text{M Eq Trolox/mg}$ frente a mM Eq Trolox/mg , respectivamente. La razón de estas diferencias se debe probablemente a la distinta solubilidad y difusión de los radicales utilizados (Zhu *et al.*, 2008), por lo tanto, podríamos considerar el método con radical de ABTS como más sensible y apropiado para la medida de la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de vaca.

Por otra parte, se ha descrito la importancia de los aminoácidos hidrofóbicos de los péptidos en su actividad antioxidante, siendo considerado el factor clave para su habilidad en la captación de radicales libres (Zou *et al.*, 2016).

Así, tanto frente al radical DPPH como al ABTS, los hidrolizados de leche de vaca preparados con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor actividad antioxidante que los elaborados con cuajo animal comercial, ya que los primeros mostraron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos así como mayor ratio de péptidos HO/HI.

IV.7.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de vaca.

El efecto de los hidrolizados en los parámetros de crecimiento bacteriano, fase lag, velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, se muestra en la Tabla IV.39.

Si analizamos el efecto en el crecimiento microbiano de los hidrolizados de leche de vaca con extracto de flor de *C. scolymus* L. sobre los microorganismos Gram negativos testados, únicamente se observó efecto inhibitorio estadísticamente significativo respecto a las curvas de crecimiento control para *E. faecalis* en el parámetro de fase lag ($P \leq 0,01$). El retardo de la fase lag se obtuvo tanto por la acción del hidrolizado total como de su fracción $<3\text{kDa}$. No obstante, la velocidad de crecimiento se vio ligeramente aumentada, y en el caso de los inóculos con la fracción de hidrolizado $<3\text{kDa}$, el crecimiento máximo aumentó de manera significativa respecto a la curva control ($P \leq 0,01$). Respecto a *E. coli* no se detectó efecto antimicrobiano de los hidrolizados sobre los parámetros de las curvas de crecimiento estudiadas.

No hubo efecto antimicrobiano de los hidrolizados de leche de vaca con extracto de flor de alcachofa frente a los microorganismos Gram positivos testados, *L. innocua* y *P. fluorescens*.

Encontramos un efecto antimicrobiano similar cuando atendemos a la actividad de los hidrolizados de leche de vaca preparados con cuajo animal comercial. Si analizamos su efecto inhibitorio en el crecimiento sobre los microorganismos Gram negativos testados, sólo se encontró efecto inhibitorio estadísticamente significativo respecto a las curvas control para *E. faecalis* en el parámetro de crecimiento de fase lag ($P \leq 0,01$). El retardo de la fase lag en *E. faecalis* se dio tanto con el hidrolizado total como con su fracción $<3\text{kDa}$. Sin embargo, la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo se vieron aumentados en las muestras con hidrolizado, siendo este incremento

estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) en las muestras ensayadas con la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado.

No hubo efecto antimicrobiano de los hidrolizados de leche de vaca con cuajo animal frente a los microorganismos Gram positivos testados, *L. innocua* y *P. fluorescens*.

Podemos concluir que los hidrolizados de leche de vaca entera preparados con proteinasas de extracto de flor de *C. scolymsus* y cuajo animal comercial no presentaron efecto antimicrobiano frente a los microorganismos evaluados. Esto puede ser debido a la baja concentración final de los hidrolizados en el ensayo, con una media de 3,9 y 1,77 mg péptidos/mL para el hidrolizado con proteinasas vegetales y su fracción $<3\text{kDa}$, respectivamente, y de 1,46 y 1,15 mg péptidos/mL para el hidrolizado con cuajo animal y su fracción $<3\text{kDa}$, respectivamente. De la misma manera, De Gobba *et al.* (2014b) no encontró actividad antimicrobiana en sus hidrolizados proponiendo también como razón más probable la baja concentración de péptidos bioactivos con posible efecto inhibidor. Por otro lado, Arruda *et al.* (2012) estudiaron el efecto antimicrobiano de hidrolizados de caseína bovina obtenidos mediante proteasas extraídas del látex de *Jacataria corumbensis*, probando distintas concentraciones de hidrolizado, mostrando actividad en un rango de concentración entre 50-250 mg/mL. Así también, Théolier *et al.* (2013) en la evaluación de la actividad antimicrobiana del hidrolizado mediante enzimas gastrointestinales de proteínas de suero no detectaron actividad por debajo de la concentración de 75 mg/mL frente a *L. ivanovii*.

Sin embargo, Ripolles *et al.* (2015), observaron actividad antimicrobiana de hidrolizados de lactoferrina bovina con pepsina, quimosina y cuajo microbiano frente a *L. monocytogenes* en un rango de concentración entre 0,25 y 1mg/mL. También Osman *et al.* (2016) encontraron actividad antimicrobiana frente *S. typhimurium*, *St. aureus*, *E. coli* y *B. cerus* en hidrolizados de suero bovino con alcalasa indicando una concentración mínima inhibitoria en un rango entre 0,09 y 1,20 mg proteína/mL.

Por otra parte, en relación con la actividad potenciadora del crecimiento, también se ha descrito la actividad estimulante del crecimiento bacteriano del fragmento 48-52 (STADA) de la cadena β de la hemoglobina bovina. Este péptido mostró actividad estimulante del crecimiento sobre bacterias Gram negativas (Zhao *et al.*, 1996).

Tabla IV. 39. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de vaca con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal. (Valores de medias y error estándar).

Especie	Tamaño	Parámetros	Control	Naturaleza enzimática	
				Ext. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)
<i>E. faecalis</i>	HT	Lag	449,16 ± 20,9	565,32 ± 39,9**	607,3 ± 17,2**
		Velocidad	1,81 ± 0,2	2,34 ± 0,4	2,83 ± 0,3
		Cto. máx	0,533 ± 0,01	0,534 ± 0,02	0,569 ± 0,01
	<3kDa	Lag	449,16 ± 20,9	545,20 ± 15,6**	580,43 ± 16,9**
		Velocidad	1,81 ± 0,2	2,72 ± 0,2	2,84 ± 0,3 ^{>}
		Cto. máx	0,533 ± 0,01	0,632 ± 0,01 ^{>>}	0,584 ± 0,01 ^{>}
<i>E. coli</i>	HT	Lag	426,46 ± 5,7	415,03 ± 9,7	404,36 ± 4,2
		Velocidad	2,82 ± 0,1	3,27 ± 0,2 ^{>}	3,16 ± 0,1
		Cto. máx	0,686 ± 0,01	0,869 ± 0,01 ^{>>}	0,833 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	426,46 ± 5,7	394,20 ± 4,9 ^{>>}	390,22 ± 3,8 ^{>>}
		Velocidad	2,82 ± 0,1	3,25 ± 0,1 ^{>}	3,31 ± 0,1 ^{>}
		Cto. máx	0,686 ± 0,01	0,842 ± 0,01 ^{>>}	0,839 ± 0,01 ^{>>}
<i>L. innocua</i>	HT	Lag	431,11 ± 52,6	382,85 ± 16,7	388,32 ± 24,6
		Velocidad	1,61 ± 0,1	1,56 ± 0,1	1,57 ± 0,1
		Cto. máx	0,361 ± 0,02	0,399 ± 0,01	0,387 ± 0,02
	<3kDa	Lag	431,11 ± 52,6	426,82 ± 14,7	523,10 ± 25,6
		Velocidad	1,61 ± 0,1	1,26 ± 0,1	1,15 ± 0,2
		Cto. máx	0,361 ± 0,02	0,391 ± 0,02	0,314 ± 0,06
<i>P. fluorescens</i>	HT	Lag	435,30 ± 7,8	290,88 ± 14,7 ^{>>}	396,05 ± 29,1
		Velocidad	1,49 ± 0,0	1,20 ± 0,0 ^{>}	1,18 ± 0,1 ^{>}
		Cto. máx	0,738 ± 0,01	0,693 ± 0,03	0,898 ± 0,06 ^{>>}
	<3kDa	Lag	435,30 ± 7,8	476,17 ± 19,6	455,11 ± 12,3
		Velocidad	1,49 ± 0,0	1,81 ± 0,1 ^{>}	1,31 ± 0,0
		Cto. máx	0,738 ± 0,01	1,212 ± 0,02 ^{>>}	0,990 ± 0,02 ^{>>}

(Lag: Fase Lag en minutos; Velocidad: velocidad de crecimiento en mUAbs/min; Cto. máx.: crecimiento máximo en UAbs).

Test de Dunnett: *: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,05$); **: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,01$); >: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,05$); >>: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,01$). Cuando no aparecen superíndices no hubo efecto estadísticamente significativo ($P > 0,05$) del hidrolizado en el parámetro.

IV.8. CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE HIDROLIZADOS DE LECHE DE CABRA DE ALTA PASTEURIZACIÓN OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L. Y CUAJO ANIMAL.

IV.8.1. Concentración de NNP de los hidrolizados de leche de cabra.

Como se ha comentado, se obtuvieron dos hidrolizados de leche de cabra entera sometida a condiciones de alta pasteurización, y obtenidos con extracto de flor de alcachofa (HLC EA) y cuajo animal comercial (quimosina y pepsina) (HLC CA), al tiempo de hidrólisis de dieciséis horas. Además, para cada hidrolizado, se obtuvieron mediante ultrafiltración, las fracciones de peso molecular <3kDa.

En la Tabla IV.40 se muestra la concentración de NNP de los hidrolizados de leche de cabra totales (HT) y sus fracciones <3kDa.

Respecto al tipo de enzima utilizado en la hidrólisis, los hidrolizados preparados con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor concentración de NNP (5,10 mg/mL), que los obtenidos a partir de cuajo animal comercial (3,63 mg/mL) ($P \leq 0,05$). La fracción <3kDa del hidrolizado con extracto de flor de alcachofa también presentó una mayor concentración de NNP (2,68 mg/mL) en comparación con su análoga con cuajo animal (2,12 mg/mL), aunque la diferencia en este caso fue menor y estadísticamente no significativa ($P > 0,05$).

Las fracciones de peso molecular <3kDa presentaron menor concentración de NNP que sus hidrolizados totales ($P < 0,01$).

Tabla IV. 40. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
NNP (mg/mL)	HT	5,10 ± 0,33 _a	3,63 ± 0,10 _b	<0,01	<0,01	≤0,05
	<3kDa	2,68 ± 0,13 _c	2,12 ± 0,17 _c			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

_{a,b,c}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

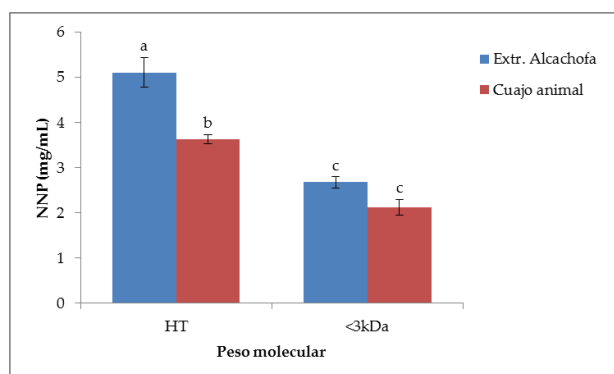


Figura IV. 46. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la concentración de NNP (mg/mL) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)).

No se han encontrado publicaciones con información sobre la concentración en NNP o peptídica de hidrolizados de leche de cabra. Como en el caso de la leche de vaca, los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor concentración de NNP.

IV.8.2. Perfil cromatográfico y proporción de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de leche de cabra.

En la Tabla IV.41 se muestra el efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la cantidad de péptidos totales, hidrófobos e hidrófilos de los hidrolizados de leche de cabra, expresados como unidades de área cromatográfica (u.a.c.) por μg de NNP de hidrolizado. Los perfiles cromatográficos de los hidrolizados se muestran en la Figura IV.47.

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa a la concentración de área total cromatográfica de los hidrolizados ($P < 0,01$). El hidrolizado elaborado con proteasas de flor de alcachofa tuvo mayor concentración de péptidos, en cuanto unidades de área total cromatográfica se refiere ($163,20 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP), que el hidrolizado preparado con cuajo animal ($96,46 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP) ($P \leq 0,05$).

Tabla IV. 41. Efecto del tipo de enzima en la cantidad de péptidos de los hidrolizados de leche de cabra expresada en unidades de área cromatográfica μg^{-1} de NNP del hidrolizado. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Total/ μg	HT	$163,20 \cdot 10^4 \pm 15,72 \cdot 10^4_a$	$96,46 \cdot 10^4 \pm 3,55 \cdot 10^4_b$	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$62,62 \cdot 10^4 \pm 13,50 \cdot 10^4_c$	$19,17 \cdot 10^4 \pm 1,48 \cdot 10^4_d$			
HI/ μg	HT	$10,59 \cdot 10^4 \pm 1,29 \cdot 10^4_a$	$12,45 \cdot 10^4 \pm 3,13 \cdot 10^4_a$	>0,05	>0,05	>0,05
	<3kDa	$15,51 \cdot 10^4 \pm 2,02 \cdot 10^4_a$	$13,00 \cdot 10^4 \pm 0,81 \cdot 10^4_a$			
HO/ μg	HT	$152,61 \cdot 10^4 \pm 15,11 \cdot 10^4_a$	$84,01 \cdot 10^4 \pm 5,15 \cdot 10^4_b$	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$47,11 \cdot 10^4 \pm 11,48 \cdot 10^4_c$	$6,18 \cdot 10^4 \pm 0,76 \cdot 10^4_d$			
HO/HI	HT	$14,68 \pm 1,85_a$	$7,71 \pm 2,01_b$	<0,01	<0,01	>0,05
	<3kDa	$2,94 \pm 0,37_c$	$0,47 \pm 0,04_d$			

(Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Los hidrolizados totales presentaron mayor área total cromatográfica por μg de NNP que sus fracciones de peso molecular <3kDa ($P < 0,05$). De la misma manera, los hidrolizados totales de leche de vaca presentaron mayor concentración de péptidos totales por μg de NNP en comparación con sus fracciones <3kDa.

El tipo de enzimas utilizado no influyó de manera significativa a la concentración de péptidos hidrófilos presentes en los hidrolizados ($P > 0,05$). El hidrolizado con extracto de flor de alcachofa presentó una media de $10,59 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP de péptidos hidrófilos, y su análogo con cuajo animal de $12,45 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de péptidos hidrófilos por μg de NNP entre los hidrolizados totales y sus fracciones <3kDa ($P > 0,05$), presentando las fracciones <3kDa del hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de alcachofa y cuajo animal las concentraciones de $15,51 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP y $13,00 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP, respectivamente. Sin embargo, en los hidrolizados de leche de vaca sí se observaron diferencias en la

concentración de péptidos hidrofílicos por μg de NNP de los hidrolizados totales y sus fracciones $<3\text{kDa}$ ($P<0,05$), presentando mayor proporción de péptidos hidrofílicos las fracciones $<3\text{kDa}$.

La concentración de péptidos hidrofóbicos de las muestras se vio afectada de manera significativa ($P<0,01$) por el tipo de enzima utilizado. El hidrolizado total de leche de cabra elaborado con extracto de flor de alcachofa presentó una media de 1,8 veces más concentración de péptidos hidrofóbicos que los hidrolizados preparados con cuajo animal ($P\leq 0,05$) ($152,61 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP *vs.* $84,01 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP). En el caso de sus fracciones $<3\text{kDa}$ la diferencia fue todavía mayor, presentando el hidrolizado con enzima vegetal 7,6 veces más concentración de péptidos hidrofóbicos que su análogo con cuajo animal ($P\leq 0,05$) ($47,11 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP *vs.* $6,18 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP).

Al igual que en el caso de los hidrolizados de leche de vaca, las fracciones $<3\text{kDa}$ de los hidrolizados de leche de cabra obtenidos tanto con extracto de flor de alcachofa como con cuajo animal presentaron una menor concentración de péptidos hidrofóbicos por μg de NNP respecto a sus hidrolizados totales ($P\leq 0,05$). Esto puede ser debido a que el peso molecular influye en el tiempo de elución de los péptidos apareciendo los péptidos pequeños a menores tiempos de elución (De Gobba *et al.*, 2014b) y considerándolos de esta manera hidrofílicos.

El ratio de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos también se vio afectado de manera significativa por el tipo de enzimas utilizado ($P<0,01$). El hidrolizado de leche de cabra preparado con enzima vegetal presentó un mayor ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos, 14,68, que el hidrolizado preparado con cuajo animal, 7,71 ($P\leq 0,05$). Lo mismo ocurrió si nos referimos a sus fracciones $<3\text{kDa}$, donde la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado con enzima vegetal presentó un ratio de 2,94 frente al de 0,47 de la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado con cuajo animal.

El ratio de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos fue menor en las fracciones de peso molecular $<3\text{kDa}$ respecto a sus hidrolizados totales en los dos tipos de hidrolizados ($P\leq 0,05$). Lo mismo se observó si nos referimos a los hidrolizados de leche de vaca.

Si atendemos a los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de leche de cabra (Figura IV.47), podemos observar una gran diferencia entre la hidrólisis producida por las proteinasas extraídas de flor de *C. scolymus* L. y la obtenida con el cuajo animal comercial. Los hidrolizados elaborados con extracto de flor de

alcachofa presentan una proteólisis más intensa con la aparición de un gran número de péptidos concentrados mayormente entre los 46 y 84 minutos de tiempo de elución (solvente más apolar). En los hidrolizados obtenidos a partir de cuajo animal se observan tres picos principales de gran intensidad a los tiempos de elución de 58-60, 69 y 80 minutos. Por otra parte, la fracción de peso molecular <3kDa de la muestra con extracto vegetal, presenta una gran cantidad de péptidos y de mayor intensidad que los observados en el cromatograma de la fracción <3kDa de la muestra con cuajo animal.

Al igual que ocurrió con la leche de vaca, los hidrolizados obtenidos con proteasas de extracto de flor de *C. scolymus* L. mostraron mayor número de péptidos que los obtenidos utilizando cuajo animal comercial, así como mayor ratio de péptidos HO/HI. Las diferencias en la actividad enzimática de las distintas proteasas utilizadas podría explicar los cambios en la producción de péptidos entre los dos tipos de hidrolizados. Como se explicó anteriormente en referencia a los hidrolizados de leche de vaca (apartado IV.7.2) varios autores han estudiado las proteasas con capacidad coagulante de *Cynara scolymus* observando algunas diferencias en la especificidad con respecto a la quimosina, enzima principal del cuajo animal (Llorente *et al.*, 2004 y 2014; Sidrach *et al.*, 2005).

Como ya se ha comentado anteriormente, la extensión de la hidrólisis de las caseínas por el extracto de alcachofa es similar a la obtenida con extractos solubles en agua de *C. cardunculus* (Sidrach *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2002). En este sentido, Sousa y Malcata (1998), estudiaron la proteólisis de las caseínas caprinas por parte de las cardosinas presentes en el extracto de flor de *C. cardunculus*. Así, observaron que las cardosinas se unían a la κ -caseína en el enlace Lys₁₁₆-Thr₁₁₇, mientras que en la κ -caseína bovina y ovina el enlace más susceptible es el Phe₁₀₅-Met₁₀₆ (Campos *et al.*, 1990). Las cardosinas mostraron especificidad por los enlaces Glu₁₀₀-Thr₁₀₁, Leu₁₂₇-Thr₁₂₈, Pro₁₃₆-Leu₁₃₇ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ de la β -caseína caprina. Respecto a la α _{s1}-caseína caprina, se observó que las cardosinas se unían en sus enlaces Phe₂₃-Val₂₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ y Tyr₁₇₃-Thr₁₇₄. En cuanto a la α _{s2}-caseína caprina, ésta es escindida por las cardosinas en los enlaces Ser₉-Ser₁₀, Phe₈₈-Tyr₈₉ y Tyr₁₇₉-Leu₁₈₀ (Sousa y Malcata, 1998).

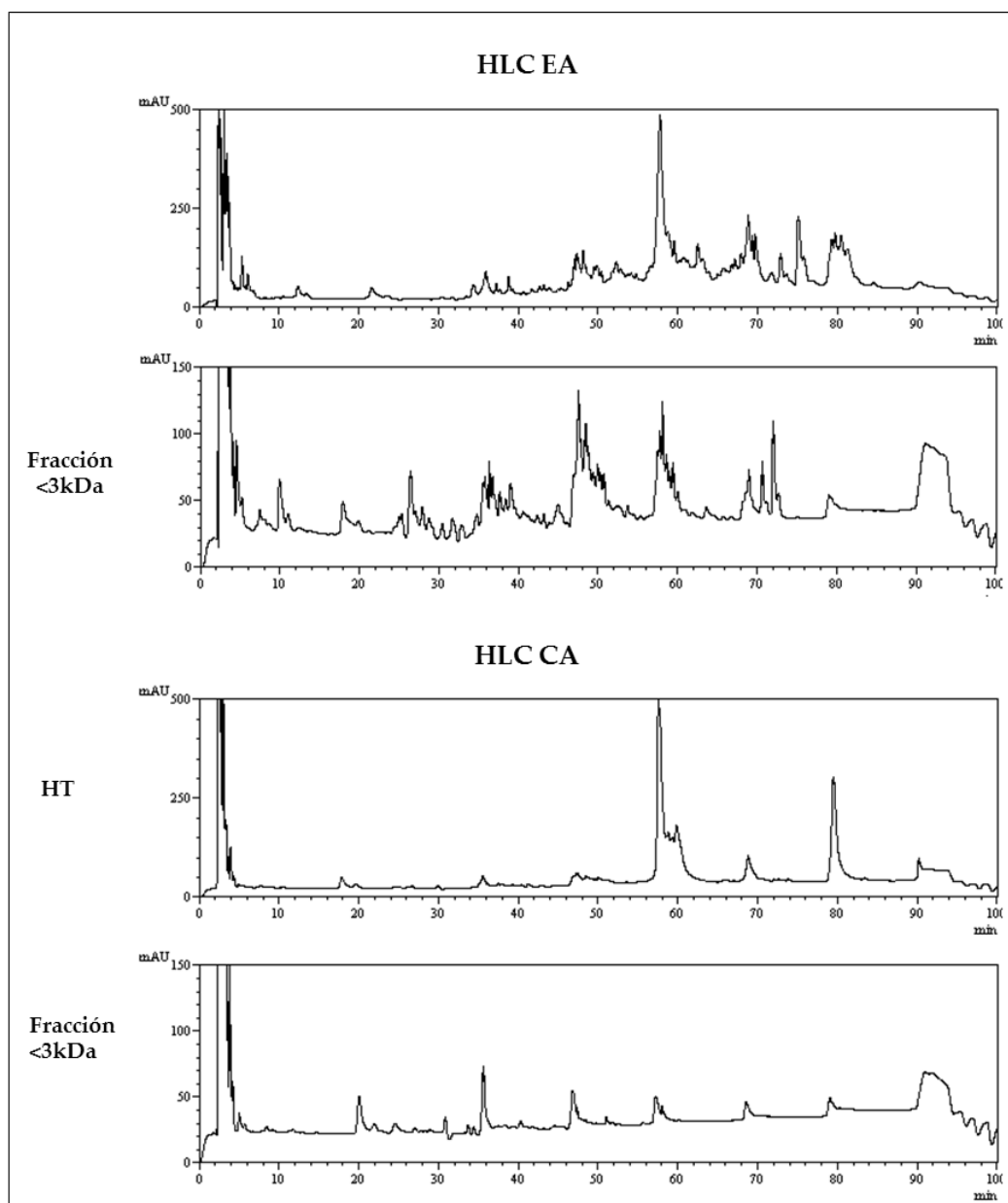


Figura IV. 47. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de leche de cabra preparados con proteasas de extracto de flor de alcachofa (HLC EA) y cuajo animal (HLC CA).

Por otra parte, como se ha mencionado ya en otros apartados, diversos autores observaron en la elaboración de quesos una mayor formación de péptidos hidrofóbicos con el uso de estas enzimas como coagulantes vegetales en

comparación con el uso de enzimas de origen animal o microbiano (Agboola *et al.*, 2004; Carrera *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2009; Tejada *et al.*, 2008; Timón *et al.*, 2014). Esto podría explicar el mayor número de péptidos producidos en nuestros hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolymus* frente al hidrolizado con cuajo animal comercial, así como el mayor ratio de péptidos HO/HI.

IV.8.3. Actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de cabra.

En la Tabla IV.42 y la Figura IV.48, se muestra la actividad IECA de los hidrolizados de leche de cabra totales así como la de sus fracciones <3kDa, elaborados con proteasas de extracto de flor de *C. scolymus* L. y con cuajo animal comercial.

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa ($P < 0,01$) a la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de cabra. La hidrólisis con extracto de flor de alcachofa rindió péptidos con mayor actividad IECA-I ($P \leq 0,05$) que los obtenidos a partir de la hidrólisis con cuajo animal, presentando una inhibición del 55,62% y 12,57%, respectivamente. Lo mismo sucedió si nos referimos a las fracciones de bajo peso molecular, con una actividad IECA del 62,94% para la fracción <3kDa del hidrolizado con enzima vegetal y del 27,81% para la fracción <3kDa del hidrolizado con cuajo animal ($P \leq 0,05$).

La mayor actividad IECA-I de los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa, puede ser debida a que estos hidrolizados presentaron una considerable mayor concentración de péptidos hidrofóbicos y mayor ratio HO/HI que los hidrolizados obtenidos con el cuajo animal, siendo los péptidos con residuos hidrofóbicos los que han demostrado mayor actividad IECA (Cheung *et al.*, 1980). De forma similar, Espejo-Carpio *et al.* (2013) a partir de leche UHT de cabra comercial obtuvieron mayor actividad IECA en sus hidrolizados elaborados con subtilisina: 60,5%, que los elaborados con tripsina: 50,9%.

El peso molecular de los péptidos de los hidrolizados de leche de cabra no afectó de manera estadísticamente significativa a la actividad IECA-I del conjunto de las muestras ($P > 0,05$). No obstante las fracciones de peso molecular <3kDa mostraron una ligera mejor actividad IECA, presentando mayores porcentajes de inhibición que los obtenidos para los hidrolizados totales: 55,62% *vs.* 62,94%, en el

caso del hidrolizado con extracto de alcachofa, y 12,57% *vs.* 27,81% en el caso del hidrolizado con cuajo animal. En el caso del valor de IC₅₀ en de los hidrolizados con cuajo animal, la fracción <3kDa presentó un valor más bajo ($P \leq 0,05$) (indicando mayor actividad) que el observado para el hidrolizado total: 395,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *vs.* 632,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

En el caso de los hidrolizados de leche de vaca, el peso molecular de los péptidos sí influyó de manera estadísticamente significativa en la actividad IECA-I ($P < 0,05$), mostrando mejor actividad las fracciones <3kDa de los hidrolizados.

Tabla IV. 42. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
% IECA-I	HT	55,62 \pm 0,89 _a	12,57 \pm 0,35 _b	$\leq 0,01$	$> 0,05$	$> 0,05$
	<3kDa	62,94 \pm 6,72 _a	27,81 \pm 13,91 _b			
IECA-I (IC ₅₀ : $\mu\text{g}/\text{mL}$)	HT	109,63 \pm 6,00 _a	632,88 \pm 51,25 _c	$\leq 0,01$	$> 0,05$	$> 0,05$
	<3kDa	100,38 \pm 12,63 _a	395,44 \pm 146,5 _b			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo de enzima; P^2 : efecto del peso molecular; P^3 : efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

^{a,b}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Como ya se ha comentado, la mayor actividad IECA-I de las fracciones <3kDa de los hidrolizados puede ser debido a que, por el menor tamaño de los péptidos presentes, éstos podrían tener mejor accesibilidad para unirse al sitio activo de la ECA (Natesh *et al.*, 2003). Así también, Tagliazucchi *et al.* (2017) encontraron mayor actividad IECA en la fracción <3kDa de sus hidrolizados de leche de cabra desnatada mediante su digestión gastrointestinal *in vitro*, presentando un valor de IC₅₀ de 1156,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, frente a su hidrolizado total, que dio una IC₅₀ de 1808,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que no se detectó actividad en la fracción >3kDa, sugiriendo que los péptidos de bajo peso molecular fueron los responsables de la actividad IECA obtenida en los hidrolizados de leche de cabra.

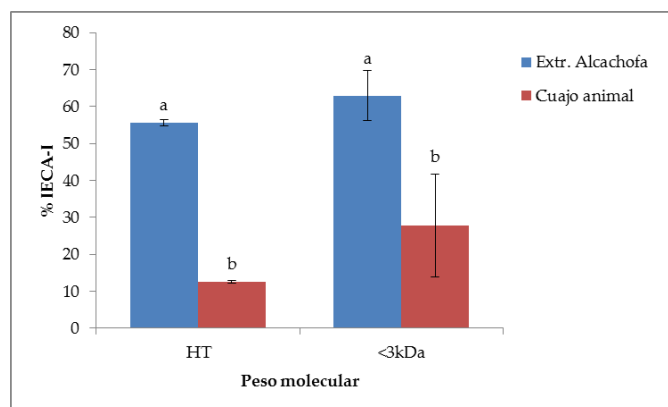


Figura IV. 48. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Nuestros resultados de actividad IECA de los hidrolizados a partir de leche de cabra son comparables a los encontrados en otros estudios. Por ejemplo, Silva *et al.* (2006) encontraron una inhibición de la ECA entre 48% y 63,43% para los extractos solubles en agua obtenidos de quesos de leche de cabra elaborados con proteasas de *C. cardunculus*. Espejo-Carpio *et al.* (2016) realizaron la hidrólisis a partir de leche de cabra U.H.T. comercial empleando subtilisina, tripsina y la mezcla de ambas, obteniendo hidrolizados a tiempo de tres horas que mostraron inhibición de la ECA con un rango de valores de IC_{50} entre 230,7 y 269 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, Ibrahim *et al.* (2017) encontraron mucha mayor actividad en sus hidrolizados de caseína y suero de leche de cabra con pepsina que la observada en nuestros HLC con extracto de flor de *C. scolymsus* L. y cuajo animal, alcanzado un 95% de inhibición a la concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Merece la pena mencionar que en varios trabajos se ha otorgado a la hidrólisis de las caseínas la mayor producción de péptidos con actividad IECA frente a la hidrólisis de las proteínas del suero (Espejo-Carpio *et al.*, 2013; FitzGerald y Meisel, 2000; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1998; Saito, 2008). No obstante, Ibrahim *et al.* (2017) indicaron que sus hidrolizados de suero de leche de cabra mostraron una relación dosis-dependiente más pronunciada y mayor potencia IECA que los hidrolizados a partir de caseína.

IV.8.4. Actividad antioxidante y quelante del Fe²⁺ de los hidrolizados de leche de cabra.

En la Tabla IV.43 y la Figura IV.49, se muestra el efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad captadora del radical DPPH de los hidrolizados de leche de cabra obtenidos a partir de extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

Tabla IV. 43. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P ¹	P ²	P ³
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA DPPH %	HT	79,02 ± 2,01 _a	27,62 ± 0,92 _c	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	40,93 ± 1,34 _b	19,10 ± 0,40 _d			
RSA DPPH (µMEqTrolox/mg)	HT	9,02 ± 0,85 _a	4,39 ± 0,26 _b	<0,01	>0,05	>0,05
	<3kDa	8,83 ± 0,66 _a	5,24 ± 0,45 _b			

ANOVA: P¹: efecto del tipo de enzima; P²: efecto del peso molecular; P³: efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

El tipo de enzima utilizado afectó de manera significativa en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra frente al radical DPPH (P<0,01). El hidrolizado elaborado con extracto de flor de alcachofa presentó mayor actividad que su análogo con cuajo animal (P≤0,05). El hidrolizado de cabra preparado con proteinasas de *C. scolymus* L. presentó un porcentaje medio de captación del DPPH• de un 79,02% y su fracción <3kDa de un 40,93%, frente al 27,62% del HT obtenido con cuajo animal y del 19,10% de su fracción <3kDa. Si atendemos al TEAC (actividad equivalente al Trolox de los hidrolizados por mg de péptidos), la muestra que presentó mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH• fue la correspondiente al hidrolizado total de leche de cabra con extracto de flor de alcachofa con un valor de 9,02 µM Eq Trolox/mg.

Al igual a lo descrito en el caso de los hidrolizados de la leche de vaca, si consideramos el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizados de leche de cabra, se puede observar que el peso molecular de los péptidos afectó de manera

estadísticamente significativa en la captación del radical DPPH ($P < 0,01$), siendo mayor la inhibición del radical por parte de los hidrolizados totales ($P \leq 0,05$). Esta diferencia se debe a la influencia de la concentración peptídica de los hidrolizados, siendo mayor la concentración de péptidos en los hidrolizados totales respecto a sus fracciones $<3\text{kDa}$, ya que se ha demostrado que la inhibición del radical de DPPH es dosis dependiente (Ahmed *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2011; Timón *et al.*, 2014). Sin embargo, si atendemos al TEAC ($\mu\text{M Eq Trolox/mg}$ de péptidos), dicha diferencia no fue significativa ($P > 0,05$).

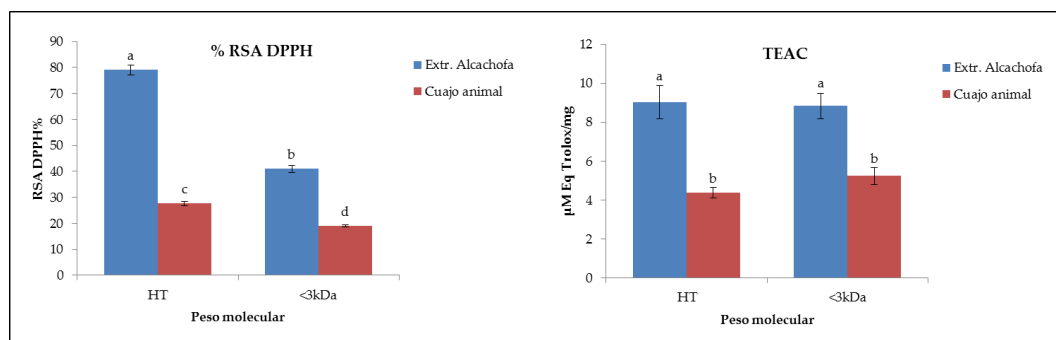


Figura IV. 49. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante frente al radical de DPPH de hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Podemos afirmar que el hidrolizado de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolymsus* presentó mayor actividad antioxidante frente al radical de DPPH que el hidrolizado con cuajo animal. En este sentido, es de esperar que diferentes hidrolizados enzimáticos posean capacidades antioxidantes distintas (Mao *et al.*, 2011), ya que dependiendo del tipo de enzima se hidrolizan enlaces peptídicos específicos (Li *et al.*, 2013). Así, los hidrolizados de leche de cabra con extracto de alcachofa presentaron una proteólisis más intensa y mayor proporción de péptidos hidrofóbicos que el hidrolizado con cuajo animal, donde la proteólisis fue menos acusada. En relación con la extensión de la proteólisis de los hidrolizados, algunos autores han relacionado el grado de hidrólisis en las proteínas lácteas con la capacidad captadora de radicales libres, estableciendo una correlación positiva (De Gobba *et al.*, 2014a; Mao *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha descrito que los aminoácidos hidrofóbicos tienen una importante

capacidad de captación de radicales libres, que implica que los péptidos con mayor contenido en aminoácidos hidrofóbicos podrían aumentar la actividad antioxidante de los hidrolizados (Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

Así, como ya se ha expuesto en el apartado referente a los hidrolizados de leche de vaca, se han encontrado diversos trabajos donde hidrolizados de proteína de leche obtenidos con enzimas vegetales presentaron mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH que los obtenidos a partir de enzimas de origen animal (Corrons *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2011; Timón *et al.*, 2014).

Respecto a hidrolizados de proteína de leche de cabra con actividad antioxidante frente al radical DPPH, Espejo-Carpio *et al.* (2016) afirmaron que en hidrolizados de caseínas procedentes de leche de cabra comercial U.H.T. preparados con subtilisina, tripsina o una combinación de ambas, se observó que los hidrolizados con tripsina tuvieron mayor actividad captadora del radical DPPH con un valor de IC₅₀ de 3,78 mg/mL. Li *et al.* (2013) también encontraron actividad antioxidante frente al DPPH en hidrolizados de caseína caprina con una combinación de proteasas neutras y alcalinas, indicando un valor de IC₅₀ de 244 µg/mL. Por último, Ahmed *et al.*, (2015) observaron actividad captadora del radical libre DPPH en hidrolizados de caseína y suero de leche de cabra, indicando que las caseínas de leche de cabra contienen péptidos antioxidante mucho más potentes que las proteínas del suero.

En la Tabla IV.44 y Figura IV.50, se muestra el efecto del tipo de enzima utilizado y el peso molecular en la captación del radical de ABTS de los hidrolizados de leche de cabra elaborados con extracto de flor de *C. scolymus* L. y por otro lado, con cuajo animal comercial.

El tipo de enzima afectó de manera significativa en la captación del radical de ABTS de los hidrolizados de leche de cabra ($P < 0,01$). Los hidrolizados elaborados con proteasas de flor de *C. scolymus* L. dieron un valor de IC₅₀ mucho menor (indicando mayor actividad) que el observado para los hidrolizados preparados con cuajo animal: 8,50 µg/mL y 36 µg/mL, respectivamente. Precisamente los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que los obtenidos con cuajo animal comercial, habiéndose descrito que los aminoácidos hidrofóbicos, incluyendo los

aminoácidos aromáticos, pueden aumentar la captación de radicales libres (Rajapakse *et al.*, 2005).

Por otra parte, los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa presentaron mayor proteólisis y producción de péptidos que los obtenidos a partir de cuajo animal, siendo coherente esta diferencia en la actividad antioxidante frente al ABTS^{•+} de los dos hidrolizados con lo descrito por algunos autores que han correlacionado de forma positiva el grado de hidrólisis de las muestras con la actividad captadora de radicales libres. Esto puede ser explicado por un incremento en el número de péptidos y una mayor disponibilidad para la interacción con el radical ABTS^{•+} (De Gobba *et al.*, 2014a; Espejo-Carpio *et al.*, 2013).

Tabla IV. 44. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra frente al radical ABTS^{•+}. (Valores de medias y error estándar).

		Naturaleza enzimática		P ¹	P ²	P ³
Tamaño		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA ABTS ^{•+} (IC ₅₀ :µg/mL)	HT	8,50 ± 0,31 _a	36,00 ± 0,05 _b	<0,01	<0,01	<0,01
	<3kDa	9,22 ± 0,60 _a	65,08 ± 1,64 _c			
RSA ABTS ^{•+} (mMEq Trolox/mg)	HT	3,37 ± 0,13 _a	0,73 ± 0,07 _b	<0,01	<0,05	>0,05
	<3kDa	3,13 ± 0,21 _a	0,43 ± 0,02 _b			

ANOVA: P¹: efecto del tipo de enzima; P²: efecto del peso molecular; P³: efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

De forma muy similar a lo observado en los hidrolizados de leche de vaca, el peso molecular de los péptidos de los hidrolizados de leche de cabra influyó de manera significativa en la captación del ABTS^{•+} (P<0,01). Al igual que en el caso de los hidrolizados de leche de vaca, esta diferencia se hizo evidente en el caso del hidrolizado total obtenido con cuajo animal (P≤0,05) y su fracción <3kDa, que mostraron unos valores de IC₅₀ de 36,00 µg/mL, y de 60,77 µg/mL, respectivamente. Como también pasara con los hidrolizados de leche de vaca, no se apreció no obstante, una diferencia significativa (P>0,05) entre el valor de IC₅₀ del hidrolizado total obtenido con extracto de flor de alcachofa (8,50 µg/mL) y su fracción <3kDa (9,22 µg/mL).

En comparación con nuestros resultados, Bezerra *et al.* (2013) en hidrolizados de caseína de leche de cabra con papaína, observó una mayor actividad captadora del radical ABTS^{•+} cuando separó el hidrolizado original mediante ultrafiltración en el retenido >3kDa y el permeado <3kDa, presentando estas dos fracciones mayor actividad que la mezcla de ambas. Sin embargo, la actividad del permeado (fracción <3kDa) fue mejor.

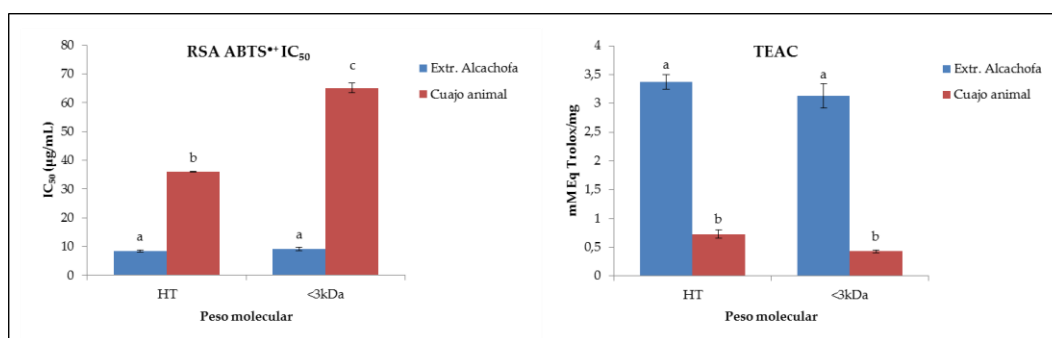


Figura IV. 50. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra frente al radical ABTS^{•+}. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

Nuestros resultados están en concordancia con los descritos por otros autores. Así, Bezerra *et al.* (2013) encontraron una alta actividad en los hidrolizados de leche de cabra elaborados con papaína a diferentes condiciones de concentración E:S y tiempos de reacción, obteniendo un rango de actividad captadora del ABTS^{•+} de 0,35 y 2,33 mM Eq Trolox/mg de proteína, siendo estos valores de TEAC más bajos (indicando menor actividad) que los obtenidos para nuestros hidrolizados con extracto de flor de alcachofa.

También se encontraron diferencias significativas en la captación del radical ABTS^{•+} entre los hidrolizados de proteínas de leche de cabra con subtilisina y tripsina, observando que la subtilisina dio hidrolizados con mayor actividad antioxidante al tener esta enzima una más amplia especificidad que la tripsina, dando lugar a un mayor grado de hidrólisis. Estos hidrolizados rindieron un valor de IC₅₀ entre 4 y 12 µg/mL (De Gobba *et al.*, 2014a) similar al obtenido con nuestros hidrolizados de leche de cabra preparados con extracto de flor de alcachofa. Por otra parte, Li *et al.* (2013) observaron un valor de IC₅₀ de 0,45 µg/mL

en sus hidrolizados de caseína de leche de cabra preparados con una combinación de enzimas neutras y alcalinas, siendo este valor unas 19 veces menor que el nuestro, demostrando mayor actividad en su hidrolizado. Esto puede ser debido a que la hidrólisis con la combinación de enzimas neutras y alcalinas da lugar a una más amplia especificidad en la proteólisis de las caseínas.

En referencia a la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra elaborados con proteasas de flor de *C. scolymsus* L. y cuajo animal, en la Tabla IV.45 y Figura IV.51, se muestran el efecto del tipo de hidrolizado y el peso molecular en los valores de IC₅₀ obtenidos para los hidrolizados totales y sus fracciones <3kDa.

Tabla IV. 45. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y error estándar).

	Tamaño	Naturaleza enzimática		P ¹	P ²	P ³
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Quelante Fe ²⁺ (IC ₅₀ :µg/mL)	HT	30,22 ± 1,01 _a	28,69 ± 2,77 _a	>0,05	<0,05	>0,05
	<3kDa	22,17 ± 1,70 _b	21,87 ± 3,92 _b			

ANOVA: P¹: efecto del tipo de enzima; P²: efecto del peso molecular; P³: efecto de la interacción tipo de enzima-peso molecular.

^{a,b}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

El tipo de enzima utilizado no afectó de manera significativa en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra (P>0,05). Al contrario, De Gobba *et al.* (2014a) sí encontraron ligeras diferencias en la actividad quelante del hierro de los hidrolizados de proteínas de leche de cabra preparados con subtilisina, siendo mayor en este caso en comparación con los elaborados con tripsina.

Por otro lado, el peso molecular de nuestros hidrolizados de leche de cabra influyó de manera significativa en la actividad quelante del hierro (II) (P<0,05). Así, también De Gobba *et al.* (2014a) encontró mayor actividad quelante en los permeados con compuestos de bajo peso molecular obtenidos de la hidrólisis de leche de cabra con subtilisina. En el caso de los hidrolizados de leche de vaca, el

peso molecular no influyó de forma estadísticamente significativa ($P>0,05$) en la actividad quelante del hierro (II).

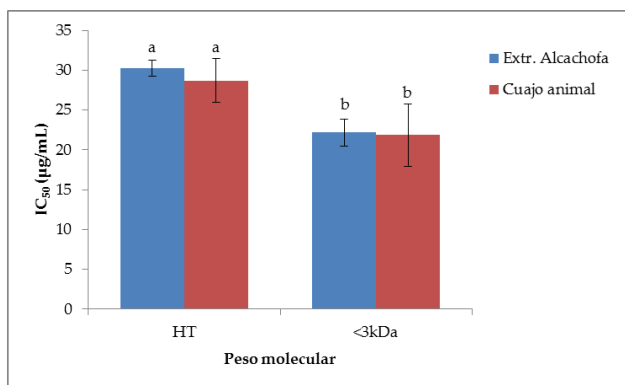


Figura IV. 51. Efecto del tipo de enzima y el peso molecular en la actividad quelante del hierro (II) de los hidrolizados de leche de cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$)).

Nuestros hidrolizados mostraron una potente capacidad quelante del hierro (II), mejor que la descrita por diversos autores en distintos hidrolizados. Por ejemplo, De Gobba *et al.* (2014a), en distintos hidrolizados de proteína de leche de cabra obtuvo una IC_{50} entre 30-60 µg/mL. De la misma manera, Li *et al.* (2013) encontraron una IC_{50} de 50 µg/mL en hidrolizados de caseína caprina.

Tanto los hidrolizados de leche de cabra obtenidos con proteinasas de extracto de flor de alcachofa como los obtenidos con cuajo animal comercial, y del mismo modo que ocurría en los hidrolizados de caseína, presentaron grandes diferencias en su capacidad captadora de radicales libres entre los distintos ensayos de actividad antioxidante. La actividad de los hidrolizados frente al radical DPPH fue sustancialmente menor a la mostrada en la inhibición del radical ABTS, con valores de TEAC de µM Eq Trolox/mg frente a mM Eq Trolox/mg, respectivamente. La razón de estas diferencias se debe probablemente a la distinta solubilidad y difusión de los radicales utilizados (Zhu *et al.*, 2008). Así, también Li *et al.* (2013) encontraron estas diferencias entre los valores de IC_{50} de actividad antioxidante frente a los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] (0,45 µg/mL vs. 244,28 µg/mL, respectivamente) en sus hidrolizados de caseína de leche de cabra con la combinación de proteasas neutras y alcalinas.

IV.8.5. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de cabra.

El efecto de los hidrolizados en los parámetros de crecimiento bacteriano, fase lag, velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, se muestra en la Tabla IV.46.

Si analizamos el efecto en el crecimiento microbiano de los hidrolizados de leche de cabra obtenidos con cuajo animal sobre los microorganismos Gram negativos testados, únicamente se observó efecto inhibitorio estadísticamente significativo respecto a las curvas de crecimiento control en *E. faecalis* en el parámetro de fase lag ($P \leq 0,01$) para la fracción <3kDa del hidrolizado. No obstante, la velocidad de crecimiento se vio ligeramente aumentada, y no hubo cambios en el crecimiento máximo del microorganismo ($P > 0,05$). Respecto a *E. coli* no se detectó efecto antimicrobiano de los hidrolizados sobre los parámetros de las curvas de crecimiento estudiadas.

No hubo efecto antimicrobiano de los hidrolizados de leche de cabra con cuajo animal frente a los microorganismos Gram positivos ensayados, *L. innocua* y *P. fluorescens*. Tampoco se observó efecto antimicrobiano de los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolymus* L. frente a los microorganismos Gram negativos y Gram positivos testados.

Podemos concluir que los hidrolizados de leche de cabra entera preparados con proteinasas de extracto de flor de *C. scolymus* y cuajo animal comercial no presentaron efecto antimicrobiano frente a los microorganismos estudiados. Esto puede ser debido a la baja concentración final de los hidrolizados en el ensayo, con una media de 2,55 y 1,34 mg péptidos/mL para el hidrolizado con proteinasas vegetales y su fracción <3kDa, respectivamente, y de 1,82 y 1,06 mg péptidos/mL para el hidrolizado con cuajo animal y su fracción <3kDa, respectivamente.

De la misma manera, otros autores han propuesto la baja concentración de péptidos en sus hidrolizados como la razón más probable de la ausencia de actividad antibacteriana, o sólo han encontrado actividad a grandes concentraciones (50-250 mg/mL) (Arruda *et al.*, 2012; de Gobba *et al.*, 2014b). Sin embargo, Osman *et al.* (2016) encontraron actividad antimicrobiana frente a *S. typhimurium*, *St. aureus*, *E. coli* y *B. cereus* en hidrolizados de suero de leche de cabra con alcalasa indicando una concentración mínima inhibitoria en un rango de 0,09 y 1,20 mg proteína/mL.

Tabla IV. 46. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal. (Valores de medias y error estándar).

Especie	Tamaño	Parámetros	Control	Naturaleza enzimática	
				Ext. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)
<i>E. faecalis</i>	HT	Lag	599,57 ± 13,6	448,11 ± 17,5 ^{>>}	539,04 ± 14,5
		Velocidad	2,83 ± 0,3	2,03 ± 0,1	1,87 ± 0,1
		Cto. máx	0,479 ± 0,01	0,719 ± 0,01 ^{>>}	0,597 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	599,57 ± 13,6	622,85 ± 67,7	750,32 ± 20,5 ^{**}
		Velocidad	2,83 ± 0,3	3,48 ± 0,7	4,03 ± 0,4
		Cto. máx	0,479 ± 0,01	0,542 ± 0,03	0,488 ± 0,03
<i>E. coli</i>	HT	Lag	399,39 ± 15,0	388,50 ± 8,8	379,34 ± 6,00
		Velocidad	1,86 ± 0,3	2,57 ± 0,2	2,15 ± 0,2
		Cto. máx	0,623 ± 0,01	0,834 ± 0,02 ^{>>}	0,832 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	399,39 ± 15,0	409,53 ± 5,4	379,76 ± 24,6
		Velocidad	1,86 ± 0,3	3,14 ± 0,1 ^{>>}	2,48 ± 0,3
		Cto. máx	0,623 ± 0,01	0,879 ± 0,01 ^{>>}	0,809 ± 0,04 ^{>>}
<i>L. innocua</i>	HT	Lag	318,03 ± 1,9	291,27 ± 10,0	304,00 ± 5,2
		Velocidad	1,31 ± 0,0	1,42 ± 0,1	1,37 ± 0,0
		Cto. máx	0,268 ± 0,00	0,379 ± 0,02 ^{>>}	0,367 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	318,03 ± 1,9	303,32 ± 14,0	314,6 ± 3,3
		Velocidad	1,31 ± 0,0	1,53 ± 0,1	1,69 ± 0,1 ^{>>}
		Cto. máx	0,268 ± 0,00	0,288 ± 0,02	0,302 ± 0,02
<i>P. fluorescens</i>	HT	Lag	438,96 ± 3,1	390,11 ± 18,2	362,34 ± 26,4
		Velocidad	1,24 ± 0,0	1,21 ± 0,0	0,97 ± 0,1
		Cto. máx	0,670 ± 0,01	0,810 ± 0,02	0,682 ± 0,03
	<3kDa	Lag	438,96 ± 3,1	438,17 ± 22,9	434,25 ± 27,9
		Velocidad	1,24 ± 0,0	1,30 ± 0,1	1,07 ± 0,1
		Cto. máx	0,670 ± 0,01	0,906 ± 0,04 ^{>>}	0,773 ± 0,04

(Lag: Fase Lag en minutos; Velocidad: velocidad de crecimiento en mUAbs/min; Cto. máx.: crecimiento máximo en UAbs).

Test de Dunnett: *: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,05$); **: Efecto negativo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,01$); >: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,05$); >>: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,01$). Cuando no aparecen superíndices no hubo efecto estadísticamente significativo ($P > 0,05$) del hidrolizado en el parámetro.

IV.9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS HIDROLIZADOS DE LECHE DE VACA Y CABRA PASTEURIZADOS OBTENIDOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L. Y CUAJO ANIMAL.

En este apartado se realiza la comparación entre composición (NNP y perfil cromatográfico) y bioactividad *in vitro*: IECA-I, antioxidante, quelante del hierro (II) y antimicrobiana, de las fracciones <3kDa (F<3kDa) de los hidrolizados de leche de vaca comercial de alta pasteurización (HLV) y de cabra sometida a condiciones de alta pasteurización (HLC) obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Como la comparación de la composición y bioactividad de los hidrolizados según el tipo de enzima utilizado en la hidrólisis (proteinasas del extracto de flor de *C. scolymus* L. o cuajo animal) así como el efecto del peso molecular de los péptidos presentes (hidrolizado total o F<3kDa) se ha llevado a cabo en los apartados relativos al HLV e HLC, nos centraremos en este apartado en la comparación descriptiva de las diferencias entre las F<3kDa de los hidrolizados causadas por la especie animal de procedencia del sustrato enzimático (leche de vaca o leche cabra).

IV.9.1. Comparación de la composición en NNP y perfil cromatográfico de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra y leche de vaca con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

En la Tabla IV.47 y Figura IV.52 se muestran las concentraciones de NNP (mg/mL), de las F<3kDa de los HLV e HLC de dieciséis horas a partir de extracto de alcachofa y cuajo animal.

Como se puede observar, la especie animal de la leche utilizada como sustrato afectó de manera significativa a la concentración de NNP de los hidrolizados ($P \leq 0,01$).

En referencia a los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa, la F<3kDa del HLV presentó una mayor concentración de péptidos (3,53 mg/mL) que su análoga a partir de leche de cabra (2,68 mg/mL) ($P \leq 0,05$).

Tabla IV. 47. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la concentración de NNP (mg/mL), péptidos totales, hidrofílicos, hidrofóbicos y ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (u.a.c./ μ g NNP) de las F<3kDa de los HLV e HLC.

	Especie	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
NNP (mg/mL)	Vaca	3,53 \pm 0,07 _a	2,30 \pm 0,20 _{bc}	\leq 0,01	\leq 0,01	0,06
	Cabra	2,68 \pm 0,13 _b	2,12 \pm 0,17 _c			

ANOVA: P^1 : efecto de la especie del sustrato enzimático; P^2 : efecto del tipo de enzima; P^3 : efecto de la interacción del sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Si atendemos a los hidrolizados obtenidos con cuajo animal, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de NNP de las F<3kDa del HLV y el HLC ($P > 0,05$). No obstante el HLV mostró una ligera mayor concentración de NNP que la obtenida en el HLC.

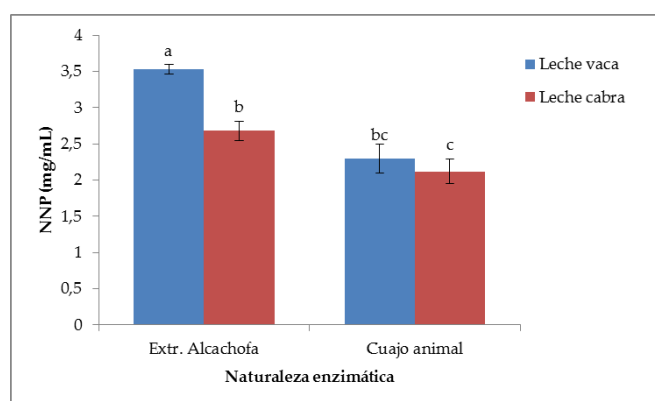


Figura IV. 52. Efecto del sustrato y el tipo de enzima en la concentración de NNP (mg/mL) de las F<3kDa del HLV e HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En la Tabla IV.48 se muestran las concentraciones expresadas en unidades de área cromatográfica (u.a.c.) por μ g NNP de péptidos totales, péptidos hidrofílicos, péptidos hidrofóbicos y ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (HO/HI) de las F<3kDa de los HLV e HLC a partir de extracto de alcachofa y cuajo animal.

Tabla IV. 48. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la concentración de péptidos totales, hidrofílicos e hidrofóbicos (u.a.c./ μg NNP) y ratio HO/HI de las F<3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra. (Valores de media y error estándar).

	Especie	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Total/μg	Vaca	$85,51 \cdot 10^4 \pm 9,2 \cdot 10^4_a$	$9,57 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4_b$	>0,05	$\leq 0,01$	>0,05
	Cabra	$62,62 \cdot 10^4 \pm 13,5 \cdot 10^4_a$	$19,17 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4_b$			
HI/μg	Vaca	$18,41 \cdot 10^4 \pm 2,7 \cdot 10^4_a$	$7,28 \cdot 10^4 \pm 1,0 \cdot 10^4_b$	>0,05	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$
	Cabra	$15,51 \cdot 10^4 \pm 2,0 \cdot 10^4_a$	$13,00 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_b$			
HO/μg	Vaca	$67,11 \cdot 10^4 \pm 7,2 \cdot 10^4_a$	$2,29 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_d$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	>0,05
	Cabra	$47,11 \cdot 10^4 \pm 11,5 \cdot 10^4_b$	$6,18 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4_c$			
HO/HI	Vaca	$3,72 \pm 0,4_a$	$0,30 \pm 0,1_c$	>0,05	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$
	Cabra	$2,94 \pm 0,4_b$	$0,47 \pm 0,0_c$			

(Total: área cromatográfica del total de péptidos del hidrolizado; HI: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: área cromatográfica correspondiente a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P^1 : efecto del tipo del sustrato enzimático; P^2 : efecto del tipo de enzima; P^3 : efecto de la interacción del tipo de sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b,c,d: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

En referencia al área total cromatográfica de los hidrolizados el tipo de leche, no afectó de manera significativa ($P > 0,05$) en la concentración de péptidos totales de las fracciones <3kDa. Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, respecto a los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa, la leche de vaca rindió una mayor concentración de péptidos totales que la leche de cabra ($85,51 \cdot 10^4 \text{ u.a.c.} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ NNP}$ frente a $62,62 \cdot 10^4 \text{ u.a.c.} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ NNP}$, respectivamente). Sin embargo, en los hidrolizados con cuajo animal, fue la leche de cabra la que dio una mayor concentración de péptidos totales en comparación con la leche de vaca .

La concentración de péptidos hidrofílicos de las F<3kDa de los hidrolizados no se vio afectada por la especie animal de procedencia de la leche ($P > 0,05$). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, respecto a los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L., el HLV mostró una mayor

concentración de péptidos hidrofílicos ($18,41 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP) que su análogo a partir de leche de cabra ($15,51 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP). Sin embargo, si nos referimos a los hidrolizados obtenidos con cuajo animal, el HLC fue el que presentó mayor concentración de péptidos hidrofílicos.

La especie animal de procedencia de la leche influyó de manera estadísticamente significativa en la concentración de péptidos hidrofóbicos de las $F < 3\text{kDa}$ de los hidrolizados. En los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa, el HLV rindió una mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que el HLC ($67,11 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP vs. $47,11 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP, respectivamente) ($P \leq 0,05$). Sin embargo, en los hidrolizados de cuajo animal, el HLC presentó 2,7 veces mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que el HLV ($6,18 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP vs. $2,29 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ NNP).

El ratio de péptidos HO/HI, considerando el conjunto de los resultados, no se vio afectado de manera significativa ($P > 0,05$) por el tipo de leche utilizado en los hidrolizados. Sin embargo, en los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa, el HLV presentó mayor ratio HO/HI que el HLC (3,72 vs. 2,94, respectivamente) ($P \leq 0,05$). Por otra parte, en los hidrolizados de cuajo animal, la el HLC mostró mayor ratio HO/HI el HLV, aunque las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$) (0,47 y 0,30, respectivamente).

Las imágenes de los perfiles cromatográficos de las $F < 3\text{kDa}$ de los hidrolizados de leche de vaca y de cabra con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal de dieciséis horas de tiempo de hidrólisis se muestran en la Figura IV.53. Si atendemos a las $F < 3\text{kDa}$ de los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa, podemos observar que ambos casos la mayor concentración de péptidos aparecen entre los tiempos de elución de 35 y 74 minutos, correspondiendo con el flujo de solvente más apolar (péptidos hidrofóbicos).

No obstante, aunque la distribución de los picos en el cromatograma es parecida entre las dos muestras, se observan diferencias cuantitativas y cualitativas entre ellas. Así, de forma general se observa una mayor intensidad de los picos en el HLV respecto al HLC. Se observan además diferencias entre los dos cromatogramas en el perfil peptídico, apareciendo picos a distintos tiempos de elución entre ellos, como por ejemplo los que aparecen del minuto 28 al 35 en el HLC y están ausentes en el cromatograma del HLV.

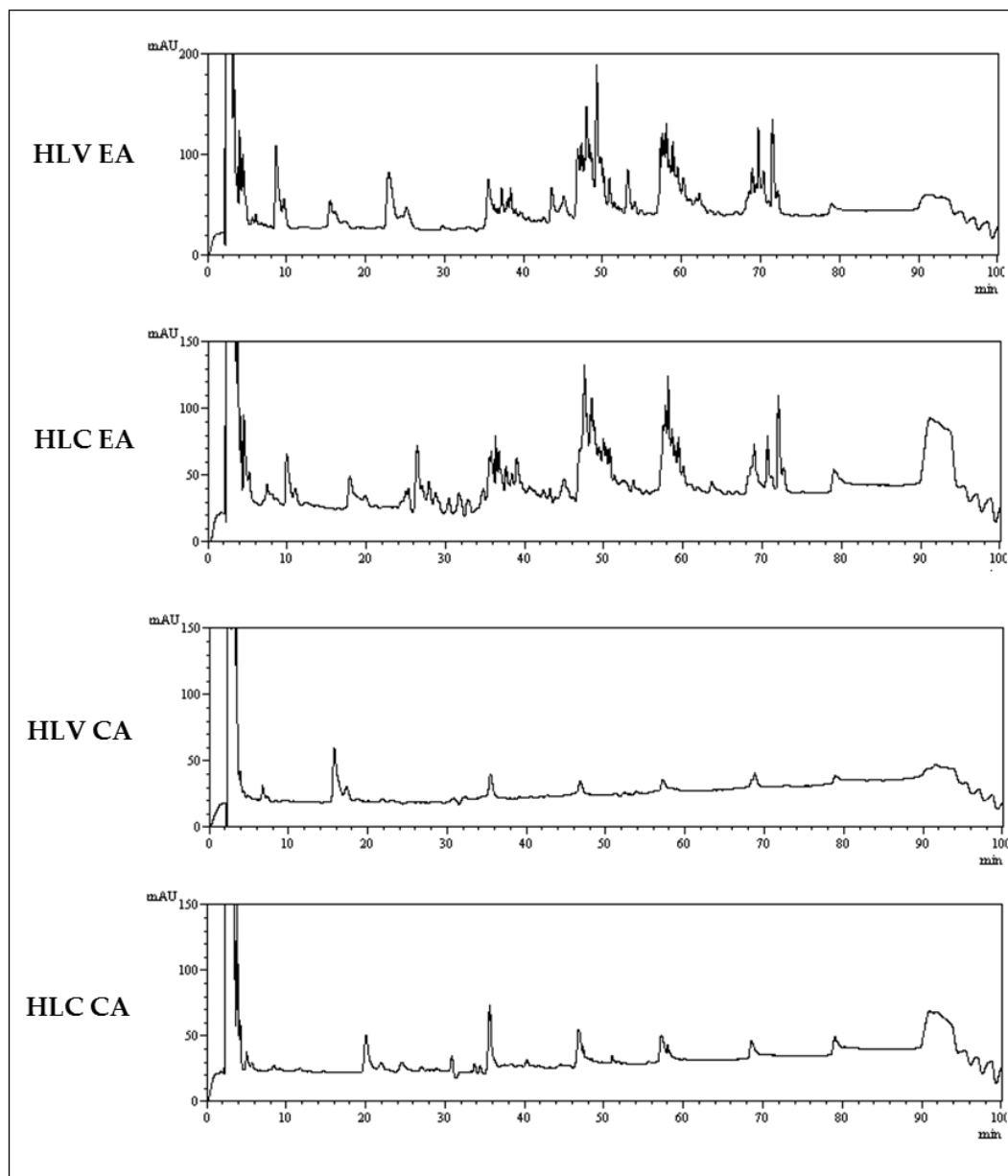


Figura IV. 53. Perfiles cromatográficos a 214 nm de las F<3kDa de hidrolizados de leche de vaca y leche de cabra obtenidos con extracto de flor alcachofa (HLV EA y HLC EA) y con cuajo animal (HLV CA y HLC CA).

Respecto a los perfiles cromatográficos de las F<3kDa obtenidas de los hidrolizados de leche de vaca y cabra con cuajo animal, se observa una distribución de los péptidos muy similar entre las muestras, siendo la diferencia

más destacable la mayor intensidad de los picos de la fracción apolar en el HLC respecto al HLV.

En general, si nos referimos a los hidrolizados preparados con el extracto de flor de *C. scolyms* L. la F<3kDa obtenida a partir del HLV rindió una mayor concentración de péptidos y un mayor ratio HO/HI que su análoga a partir del HLC.

Al contrario, si tomamos en consideración la hidrólisis de la leche con el cuajo animal, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas parece que la F<3kDa obtenida del HLC rindió una mayor concentración de péptidos totales y una mayor proporción de péptidos hidrofóbicos respecto a la F<3kDa obtenida del HLV.

IV.9.2. Comparación de la actividad IECA-I de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra y leche de vaca con extracto de flor de *C. scolyms* L. y cuajo animal.

En la Tabla IV.49 y Figura IV.54 se muestran los porcentajes e IC₅₀ de actividad IECA-I de las F<3kDa del HLV e HLC de 16 horas de tiempo de hidrólisis, obtenidos con extracto de flor de alcachofa o cuajo animal.

La especie animal de procedencia de la leche utilizada como sustrato no afectó de manera estadísticamente significativa en la actividad IECA-I.

Tabla IV. 49. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad IECA-I de las fracciones <3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).

	Especie	Naturaleza enzimática		P ¹	P ²	P ³
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
IECA (%)	Vaca	62,77 ± 1,38 _a	5,62 ± 0,31 _c	>0,05	≤0,01	>0,05
	Cabra	62,94 ± 6,72 _a	27,81 ± 13,91 _{bc}			
IECA (IC ₅₀ :µg/mL)	Vaca	92,56 ± 1,94 _a	677,39 ± 3,19 _{bc}	>0,05	≤0,01	>0,05
	Cabra	100,40 ± 12,64 _a	395,41 ± 146,50 _b			

ANOVA: P¹: efecto del tipo del sustrato enzimático; P²: efecto del tipo de enzima; P³: efecto de la interacción del tipo de sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

En referencia a los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de alcachofa, la especie animal no afectó a la actividad IECA-I de los hidrolizados de leche de vaca y cabra presentando un 62,77% y un 62,94%, respectivamente ($P>0,05$).

Si atendemos a los hidrolizados obtenidos con el cuajo animal, la especie animal tampoco influyó de forma significativa ($P\leq 0,05$) en la actividad IECA-I. Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el HLC con cuajo animal mostró mayor inhibición de la ECA (27,81%) en comparación con el HLV (5,62%). Precisamente el HLC con cuajo animal presentó más del doble de concentración de péptidos hidrofóbicos que el HLV.

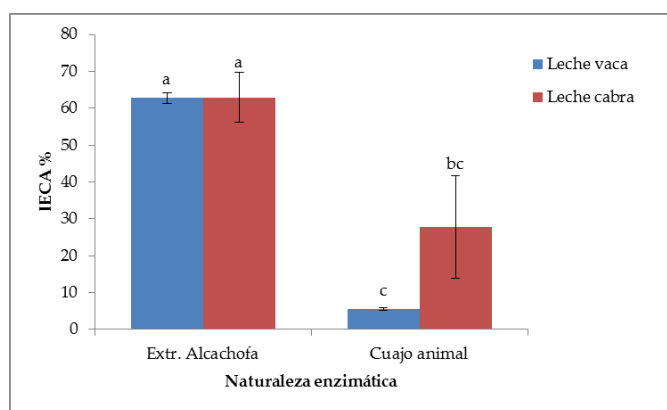


Figura IV. 54. Efecto del tipo de sustrato enzimático y el tipo de enzima en la actividad IECA de hidrolizados de leche de vaca y cabra. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$)).

IV.9.3. Comparación de la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

En la Tabla IV.50 y Figura IV.55, se presentan la actividad antioxidante frente al radical libre DPPH•- de las F<3kDa del HLV y el HLC obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

La especie animal de procedencia de la leche influyó de manera estadísticamente significativa ($P\leq 0,01$) en la actividad captadora del radical DPPH

de las F<3kDa de los hidrolizados de leche de vaca y cabra obtenidos con extracto de flor de alcachofa y cuajo animal.

En cuanto a los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L., el HLV mostró mayor actividad de captación del radical DPPH (78,82%) respecto al HLC (40,93%) ($P \leq 0,05$).

Al contrario, cuando nos referimos a los hidrolizados obtenidos con cuajo animal, aunque las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$), el HLC mostró una ligera mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH que el HLV (19,10% vs. 17,25%, respectivamente).

Tabla IV. 50. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al DPPH• de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).

	Especie	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA DPPH (%)	Vaca	78,82 ± 1,37 _a	17,25 ± 0,37 _c	≤0,01	≤0,01	≤0,01
	Cabra	40,93 ± 1,34 _b	19,10 ± 0,40 _c			
RSA DPPH (µM Eq Trolox/mg)	Vaca	12,83 ± 0,29 _a	4,35 ± 0,32 _c	≤0,01	≤0,01	≤0,01
	Cabra	8,83 ± 0,66 _b	5,24 ± 0,45 _c			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo del sustrato enzimático; P^2 : efecto del tipo de enzima; P^3 : efecto de la interacción del tipo del sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

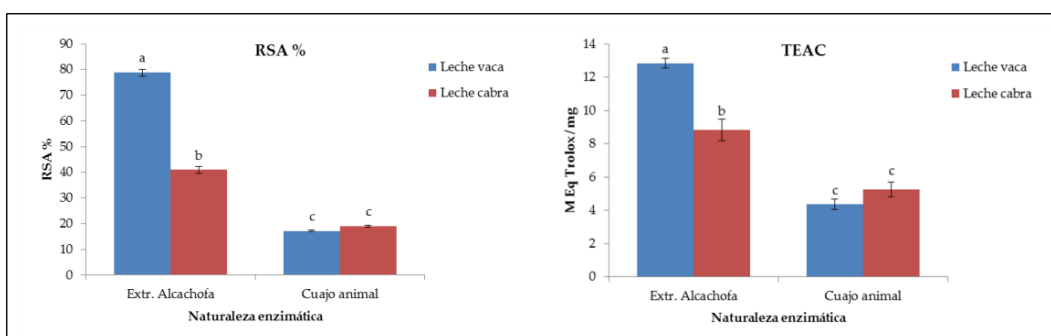


Figura IV. 55. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al DPPH• de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En ambos tipos de hidrólisis, tanto utilizando extracto de flor de alcachofa como cuajo animal, las muestras que mostraron mejor captación del radical libre DPPH fueron las que presentaron una mayor concentración de péptidos hidrofóbicos y mayor ratio HO/HI.

En la tabla IV.51 y figura IV.56, se presentan la actividad antioxidante frente al radical libre ABTS^{•+} de las F<3kDa del HLV y el HLC obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

Respecto a los hidrolizados con extracto de flor de alcachofa, la especie animal de procedencia de la leche no afectó de manera significativa ($P>0,05$) en la actividad captadora del radical de ABTS.

Tabla IV. 51. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al ABTS^{•+} de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).

	Especie	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
RSA ABTS^{•+} (IC ₅₀ :µg/mL)	Vaca	9,00 ± 0,65 _a	126,81 ± 3,32 _c	≤0,01	≤0,01	≤0,01
	Cabra	9,22 ± 0,60 _a	65,08 ± 1,64 _b			
RSA ABTS^{•+} (mM EqTrolox/mg)	Vaca	3,31 ± 0,24 _a	0,23 ± 0,01 _b	>0,05	≤0,01	>0,05
	Cabra	3,13 ± 0,21 _a	0,43 ± 0,02 _b			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo del sustrato enzimático; P^2 : efecto del tipo de enzima; P^3 : efecto de la interacción del tipo del sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b,c: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P\leq0,05$).

En cuajo animal, el tipo de leche utilizada afectó de manera estadísticamente significativa ($P\leq0,05$) a los valores de IC₅₀ de la actividad captadora del radical ABTS^{•+} de los HLV e HLC, presentado el HLC casi la mitad del valor de IC₅₀ (indicando mayor actividad). Precisamente, la F<3kDa del HLC obtenida con cuajo animal mostró mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que la del HLV. No obstante, el análisis estadístico no rindió un valor de P ($>0,05$) que sugiriera diferencias significativas en cuanto a la actividad frente al radical ABTS expresada en valores de TEAC, aunque el valor de TEAC de la F<3kDa fue casi el doble que el mostrado por la F<3kDa del HLV. Posiblemente, las diferencias no se hicieron evidentes debido a que se realizó un análisis estadístico de dos factores para presentar también el efecto de la enzima utilizada,

perdiéndose sensibilidad en comparación con un análisis individual del factor “especie animal de procedencia de la leche”.

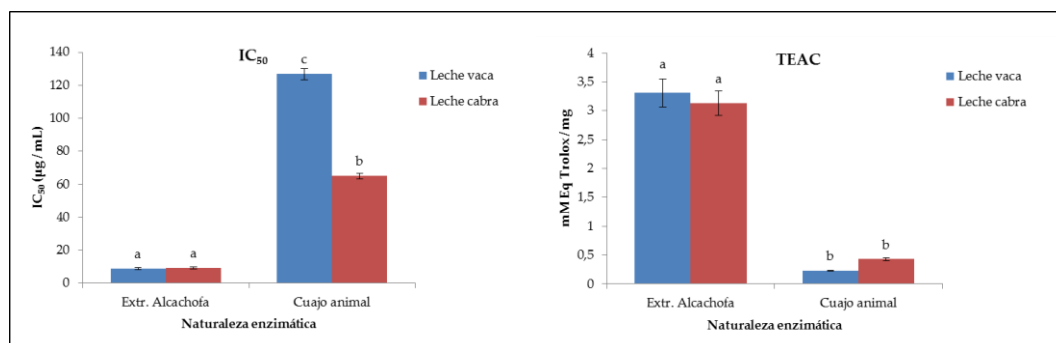


Figura IV. 56. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente al ABTS•+ de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

En la Tabla IV.52 y Figura IV.57, se presentan la actividad quelante del hierro (II) de las F<3kDa del HLV y el HLC obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal.

La especie animal de procedencia de la leche, vaca o cabra, afectó de manera significativa a la actividad quelante del hierro (II) ($P \leq 0,01$). Si atendemos a los hidrolizados con extracto de alcachofa, el HLV dio un valor de IC₅₀ ligeramente menor (16,95 µg/mL) que el observado en el HLC (22,17 µg/mL) ($P > 0,05$).

Tabla IV. 52. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad quelante del hierro (II) de las F<3kDa del HLV y el HLC. (Valores de medias y error estándar).

	Especie	Naturaleza enzimática		P^1	P^2	P^3
		Extr. Alcachofa (n=3)	Cuajo animal (n=3)			
Quelante Fe ²⁺ (IC ₅₀ : µg/mL)	Vaca	16,95 ± 1,27 _a	10,90 ± 0,14 _b	≤0,01	>0,05	>0,05
	Cabra	22,17 ± 1,70 _a	21,87 ± 3,92 _a			

ANOVA: P^1 : efecto del tipo del sustrato enzimático; P^2 : efecto del tipo de enzima; P^3 : efecto de la interacción del tipo del sustrato enzimático con el tipo de enzima.

a,b: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

Respecto a la hidrólisis con cuajo animal, el HLV fue el que mostró un valor de IC_{50} menor en comparación con el HLC, que requirió el doble de concentración (10,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a 21,87 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P \leq 0,05$).

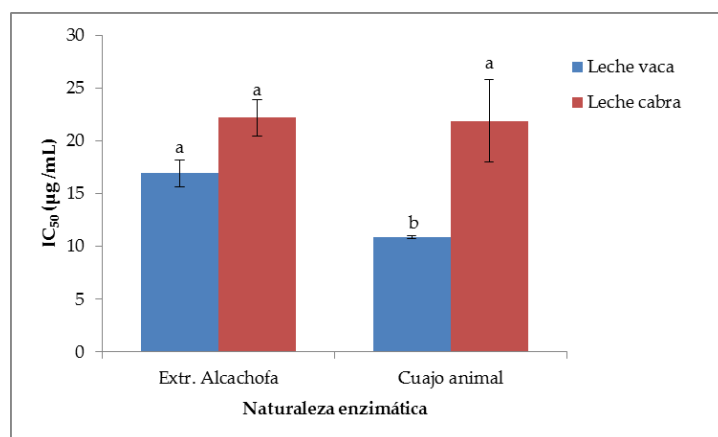


Figura IV. 57. Efecto del tipo de sustrato y tipo de enzima en la actividad quelante del hierro (II) de las $F < 3\text{kDa}$ del HLV y el HLC. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

IV.9.4. Comparación de la actividad antimicrobiana de las fracciones $< 3\text{kDa}$ de los hidrolizados de leche de vaca y cabra obtenidos con extracto de flor de *C. scolymsus* L. y cuajo animal.

Los resultados del efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de vaca y de cabra y sus fracciones de bajo peso molecular obtenidos tanto con extracto de flor de *C. scolymsus* L. como como con cuajo animal, se presentan en la Tabla IV.39 del apartado IV.7.5. y en la Tabla IV.46 del apartado IV.8.5.

No se observaron diferencias en cuanto a la especie animal de procedencia de la leche en la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de vaca y de cabra obtenidos con extracto de flor de *C. scolymsus* L. y cuajo animal comercial.

IV.10. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN Y CONGELACIÓN DE LA LECHE EN LOS HIDROLIZADOS DE LECHE DE CABRA ELABORADOS CON EXTRACTO DE FLOR DE *C. SCOLYMUS* L.

En este apartado se realiza la comparación de la composición (NNP y perfil cromatográfico) y bioactividad *in vitro*: IECA-I, antioxidante, quelante del hierro (II) y antimicrobiana, entre las fracciones de bajo peso molecular (<3kDa) de los hidrolizados elaborados con extracto de flor de *C. scolymus* L. obtenidos a partir de leche de cabra cruda y sometida a condiciones de pasteurización y congelación al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Los hidrolizados se realizaron a las condiciones óptimas de concentración de enzima y sustrato y temperatura de incubación estudiadas, utilizando como sustrato leche de cabra entera cruda en refrigeración (4°C), pasteurizada (72°C, 20 segundos) y congelada (-20°C durante 4 meses).

IV.10.1. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la composición en NNP y perfil cromatográfico de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L.

En la tabla IV.53, se muestran las concentraciones de NNP de las fracciones de bajo peso molecular (<3kDa) de hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolymus* L., obtenidos a partir de leche de cabra cruda refrigerada, pasteurizada y congelada; así como las concentraciones de péptidos totales, péptidos hidrofílicos (HI), péptidos hidrofóbicos (HO) y el ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (HO/HI) expresadas en unidades de área cromatográfica (u.a.c.) por µg de NNP de los hidrolizados.

Como se muestra en la Tabla IV.53 y Figura IV.58, los tratamientos térmicos de la leche de cabra utilizada como sustrato de la hidrólisis enzimática con proteasas presentes en el extracto de flor de alcachofa, no afectaron de manera significativa al contenido en NNP de las fracciones <3kDa de los hidrolizados ($P>0,05$).

Las fracciones < 3kDa de los hidrolizados presentaron unas medias de 2,87, 2,68 y 2,72 mg NNP/mL, para los tratamientos de refrigeración, pasteurización y congelación de la leche, respectivamente.

Tabla IV. 53. Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en la concentración de NNP (mg/mL), péptidos totales, hidrofílicos, hidrofóbicos y ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos (u.a.c./ μ g NNP) de las fracciones <3kDa de los hidrolizados. (Valores de medias y error estándar).

	Tratamiento térmico			P
	Refrigerada (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Congelada (n=3)	
NNP	2,87 \pm 0,30 _a	2,68 \pm 0,13 _a	2,72 \pm 0,04 _a	>0,05
Áreas cromatográficas				
Total/μg	50,81 \cdot 10 ⁴ \pm 10,20 \cdot 10 ⁴ _a	62,62 \cdot 10 ⁴ \pm 13,50 \cdot 10 ⁴ _a	57,30 \cdot 10 ⁴ \pm 8,50 \cdot 10 ⁴ _a	>0,05
HI/μg	17,21 \cdot 10 ⁴ \pm 3,32 \cdot 10 ⁴ _a	15,51 \cdot 10 ⁴ \pm 2,02 \cdot 10 ⁴ _a	22,91 \cdot 10 ⁴ \pm 4,12 \cdot 10 ⁴ _a	>0,05
HO/μg	33,59 \cdot 10 ⁴ \pm 6,88 \cdot 10 ⁴ _a	47,11 \cdot 10 ⁴ \pm 11,48 \cdot 10 ⁴ _a	34,40 \cdot 10 ⁴ \pm 4,65 \cdot 10 ⁴ _a	>0,05
HO/HI	1,94 \pm 0,03 _a	2,94 \pm 0,37 _b	1,53 \pm 0,12 _a	0,01

(Total: u.a.c. del total de péptidos del hidrolizado; HI: u.a.c. correspondientes a la fracción de péptidos hidrofílicos; HO: u.a.c. correspondientes a la fracción de péptidos hidrofóbicos).

ANOVA: P: efecto del tratamiento térmico.

a,b: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, $P \leq 0,05$).

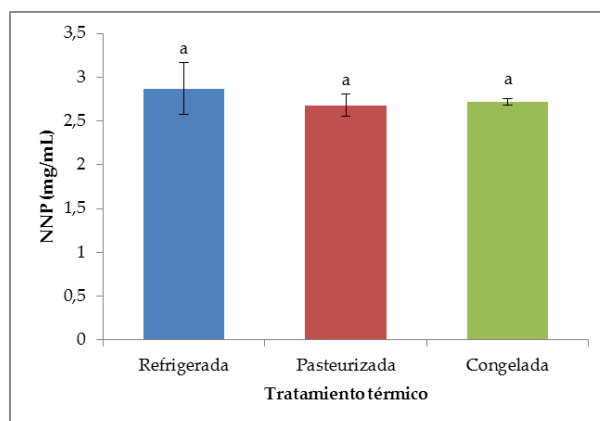


Figura IV. 58. Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en la concentración de NNP (mg/mL) de la fracción <3kDa de los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de *C. scolymsus* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

El área total cromatográfica de los péptidos presentes en las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra, no se vio afectada de manera significativa por el tipo de tratamiento térmico practicado en la leche antes de su hidrólisis ($P > 0,05$). Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, la

hidrólisis de la leche pasteurizada fue la que dio mayor área cromatográfica de péptidos totales ($62,62 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$) seguida de la hidrólisis de la leche congelada ($57,30 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$). Este resultado está en concordancia con lo observado con Datta-Roy (1982) que indicó que los tratamientos de calentamiento y congelación mejoraban la velocidad de proteólisis peptídica de la leche de vaca con pepsina.

El área cromatográfica correspondiente a los péptidos hidrofílicos de la fracción $<3\text{kDa}$ de los hidrolizados, no se vio afectada de manera significativa por el tratamiento térmico practicado en la leche de cabra previo a su hidrólisis ($P > 0,05$). Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, la hidrólisis de la leche congelada fue la que rindió mayor área cromatográfica de péptidos hidrofílicos con $22,91 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$ en comparación con el HLC refrigerada y pasteurizada ($17,21 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$ y $15,51 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$, respectivamente).

El tipo de tratamiento térmico en la leche de cabra tampoco afectó de manera significativa a la concentración de péptidos hidrofóbicos de las fracciones $<3\text{kDa}$ de los hidrolizados ($P > 0,05$). Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, la hidrólisis de la leche pasteurizada fue la que rindió mayor área cromatográfica de péptidos hidrofóbicos ($47,11 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$) en comparación con el HLC refrigerada y congelada ($33,59 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$ y $34,40 \cdot 10^4$ u.a.c. $\cdot \mu\text{g}^{-1}\text{NNP}$, respectivamente).

El ratio de péptidos HO/HI se vio afectado de manera significativa por el tipo de tratamiento térmico en la leche de cabra antes de su hidrólisis ($P < 0,01$). Como se observa en la Figura IV.59, la fracción $<3\text{kDa}$ del hidrolizado de leche de cabra pasteurizada presentó un ratio de péptidos HO/HI mayor respecto a sus análogos a partir de leche refrigerada y congelada, siendo este ratio para la hidrólisis de leche pasteurizada 1,5 veces más grande que utilizando leche refrigerada, y casi 2 veces superior que partiendo de leche congelada.

Las imágenes de los perfiles cromatográficos de las fracciones $<3\text{kDa}$ de los hidrolizados de leche de cabra refrigerada, pasteurizada y congelada preparados con extracto de flor de alcachofa se muestran en la Figura IV.60. Como se puede observar, los perfiles cromatográficos de las muestras son bastante similares entre sí. En los tres casos, la mayor concentración de péptidos aparece entre los 35 y 76 minutos de elución, correspondiendo al flujo de solvente más apolar (péptidos

hidrofóbicos). Sin embargo, si nos fijamos en el HLC de alta pasteurización se observan algunas diferencias respecto a los de leche refrigerada y congelada. En la fracción <3kDa del HLC pasteurizada aparecen una serie de picos de baja intensidad entre los 28 y 36 minutos de tiempo de elución que no se observan en las otras dos muestras. De la misma manera, Islam *et al.* (2017) observaron la producción de fragmentos más pequeños en la digestión gástrica *ex vivo* de leche de vaca pasteurizada y homogeneizada en comparación con la leche cruda. Además, la fracción <3kDa del HLC pasteurizada presentó una mayor intensidad en el conjunto de picos de la fracción de gradiente más apolar, lo que concuerda con el mayor ratio de péptidos HO/HI que mostró esta muestra respecto a sus análogas de leche refrigera y congelada.

Por otra parte, en la muestra del HLC congelada se puede observar mayor intensidad de los picos durante los primeros 27 minutos de tiempo de elución, correspondiendo con el flujo de solvente más polar (péptidos hidrofílicos) respecto a las muestras de hidrolizado de leche refrigerada y pasteurizada.

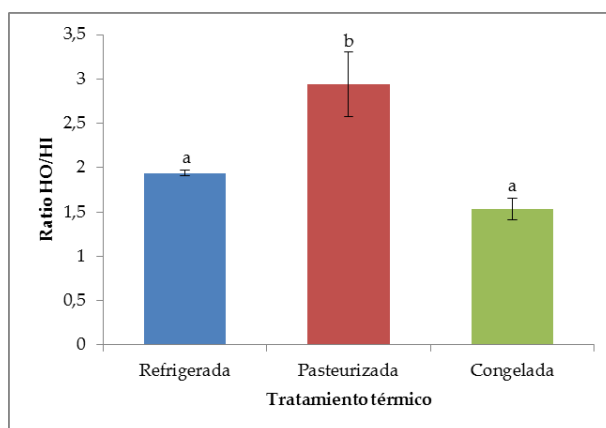
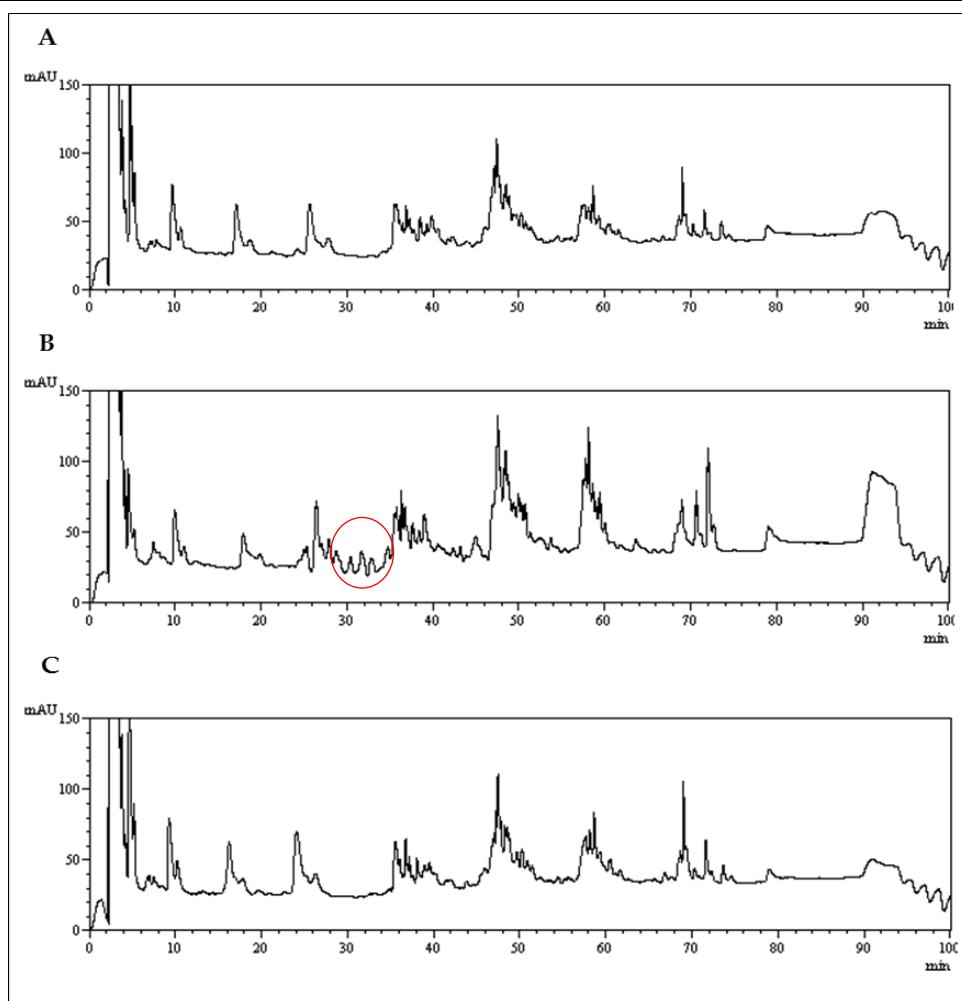


Figura IV. 59. Efecto de los tratamientos térmicos de la leche de cabra en el ratio de péptidos hidrofóbicos:hidrofílicos de la fracción <3kDa de los hidrolizados obtenidos con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).



(A: fracción <3kDa del HLC refrigerada; B: fracción <3kDa del HLC pasteurizada; C: fracción <3kDa del HLC congelada).

Figura IV. 60. Perfiles cromatográficos a 214 nm de los hidrolizados de caseína y ovoalbúmina de dieciséis horas de hidrólisis con extracto de flor de *C. scolyms* L.

Aunque no se hayan producido diferencias estadísticamente significativas, podemos afirmar que la fracción <3kDa del HLC pasteurizada presentó mayor concentración de área total cromatográfica y péptidos hidrofóbicos respecto a los hidrolizados a partir de leche cruda refrigerada y congelada. Por otra parte, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,01$) en el ratio de péptidos HO/HI, siendo el HLC pasteurizada el que mayor ratio obtuvo. Además, en los perfiles cromatográficos de las fracciones de bajo peso molecular

(<3kDa) de los hidrolizados se observó una mayor intensidad de los picos de la fracción hidrofóbica en el HLC pasteurizada respecto a sus análogos de leche cruda refrigerada y congelada.

Por otro lado, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, la hidrólisis de leche de cabra sometida a congelación presentó mayor concentración total de área cromatográfica que su análoga con leche refrigerada y fue el hidrolizado que mayor concentración de péptidos hidrofílicos y menor ratio HO/HI mostró.

Las diferencias observadas en la proteólisis de los hidrolizados de leche de cabra sometida a distintos tratamientos térmicos guardan coherencia con lo descrito por otros autores. De este modo, Barbé *et al.* (2013) en un estudio *in vivo* en humanos también observaron un efecto significativo del calentamiento de la leche en la sensibilidad de la caseína y la β -lactoglobulina en la hidrólisis gástrica. Ye *et al.* (2017) explicaron que las diferencias en la digestión gástrica de la leche sometida a tratamiento por calor son debidas a las interacciones que se producen entre las caseínas y las proteínas del suero durante el proceso de calentamiento. Así, en la leche no tratada, en condiciones de digestión gástrica con pepsina, la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina no participan en la formación de los coágulos de la leche y permanecen en la fase del suero, manteniéndose intactas tras la digestión. Sin embargo, en la leche tratada, las proteínas del suero intervienen en la formación de los coágulos y aumenta su susceptibilidad a la hidrólisis por la pepsina debido a la desnaturalización por el calor. De la misma manera, Corredig y Dalgleish (1996) indicaron que el tratamiento con calor dio lugar a cambios en la composición de la membrana del glóbulo graso de la leche debido a la incorporación de la β -lactoglobulina. De acuerdo con Houlihan *et al.* (1992), el nivel de las interacciones de la β -lactoglobulina con la κ -caseína en las membranas de los glóbulos grasos es dependiente de la extensión del tratamiento por calor. Del mismo modo, Guo *et al.* (1995) observaron que el tratamiento por calor sobre la β -lactoglobulina en solución provoca cambios en la estructura y conformación de la proteína haciendo que sea más accesible a la acción de la pepsina y mejorando la extensión de la proteólisis de la tripsina. Así también, García-Risco *et al.* (2002) indicaron que el tratamiento con calor en la leche reduce considerablemente los niveles de β -lactoglobulina séricos y aumenta los de κ -caseína en el suero, apareciendo β -lactoglobulina desnaturalizada en las micelas.

Estos mismos autores también observaron una mayor actividad proteolítica residual y una mayor susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis en leche desnatada tratada con calor y homogeneizada.

Respecto a la mayor concentración de péptidos hidrofóbicos en el HLC pasteurizada con extracto del flor de alcachofa en comparación con los HLC a partir de leche refrigerada y congelada, Yüksel *et al.* (2005) observaron que el calor afectaba a las interacciones hidrofóbicas de los componentes de la leche, indicando un incremento en los sitios de superficie hidrofóbica en las muestras de leche desnatada tratadas con calor, aumentando de forma gradual con la subida de la temperatura del tratamiento térmico hasta los 80°C durante 5 minutos.

En cuanto a las consecuencias del tratamiento de congelación de la leche, Guillami *et al.* (2015) indicaron una mayor desnaturalización y agregación de las principales proteínas del suero en leche almacenada en temperaturas de congelación. Por otro lado, Nakagawa *et al.* (2016) observaron que la congelación y descongelación de la leche modificaba la estructura de las caseínas junto con la aparición de interacciones entre coágulos o entre coágulos y hielo, y dichas modificaciones estructurales aumentaron su hidrofobicidad.

También existe bibliografía sobre diferencias en la proteólisis en quesos elaborados con leche cruda o tratada térmicamente. Hay que tener en cuenta que los resultados derivados de la proteólisis del queso no se pueden equiparar con los obtenidos en nuestros hidrolizados, ya que en la proteólisis en el queso influyen, además de las enzimas del cuajo (animal o vegetal), otros agentes y factores de gran importancia como la microflora presente y el prolongado tiempo de maduración. No obstante, Trujillo *et al.* (2002), en la proteólisis producida en queso de leche de cabra, indicaron que el queso obtenido con leche pasteurizada mostró una hidrólisis significativamente mayor ($P < 0,05$) de la α_{s1} -caseína en la primera fase de maduración (15 días) respecto al elaborado con leche cruda. De la misma manera, observaron una degradación mayor de la β -caseína en el queso de leche pasteurizada. Sin embargo, no encontraron diferencias en los niveles de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los quesos.

Por otro lado, Verdini *et al.* (2005) indicaron que el proceso de congelación previo a la fase de maduración afectó a la proteólisis del queso Por Salud Argentino. Se produjo un aumento de la hidrólisis de la α_{s1} -caseína y la α_{s1} -I-caseína, y un incremento de péptidos pequeños en la fracción soluble en agua

(incluyendo el α_{s1} -caseína (f1-23)), junto con una temprana aparición de aminoácidos libres. De la misma manera, Alichandis *et al.* (1981) observaron mayores niveles de nitrógeno soluble en TCA en el queso Teleme congelado antes del salado, hecho que atribuyeron a una mejora de la proteólisis por los cambios en la estructura de la cuajada congelada. Así, también Sendra *et al.* (1999) encontraron niveles significativamente mayores de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico en quesos de leche de oveja congelados antes del salado. De igual forma, Fontecha *et al.* (1994) observaron más del doble de nitrógeno amínico respecto al control en quesos de leche de oveja que fueron congelados el segundo día de maduración. Al contrario, Alonso *et al.* (1987) observaron una ligera menor extensión en la proteólisis del queso Cabrales respecto al control, cuando el queso fue congelado a -20°C durante 8 meses antes del proceso de maduración.

IV.10.2. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad IECA-I de la fracción <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolyms* L.

En la Tabla IV.54 y Figura IV.61 se muestran los porcentajes e IC_{50} de actividad IECA-I de las fracciones <3kDa de los hidrolizados a partir de leche de cabra sometida a diferentes tratamientos térmicos: cruda refrigerada, pasteurizada y congelada.

El tratamiento térmico aplicado en la leche de cabra previamente a su hidrólisis con extracto de flor de *C. scolyms* L., no afectó a la actividad IECA-I de las fracciones <3kDa de los hidrolizados ($P>0,05$).

Tabla IV. 54. Efecto del tipo de tratamiento térmico sobre la leche de cabra en la actividad IECA-I de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y error estándar).

	Tratamiento térmico			<i>P</i>
	Refrigerada (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Congelada (n=3)	
IECA %	56,35 ± 0,14 _a	62,94 ± 6,72 _a	50,66 ± 3,80 _a	>0,05
IECA (IC_{50})	109,96 ± 3,96 _a	100,40 ± 12,64 _a	116,42 ± 10,10 _a	>0,05

ANOVA: *P*: efecto del tratamiento térmico.

^a: Valores medios con subíndices comunes son estadísticamente iguales (Test LSD, $P>0,05$).

Aunque no se hayan presentado diferencias estadísticamente significativas, la fracción <3kDa del HLC pasteurizada fue la que mostró mayor inhibición de la ECA con un actividad del 62,94% frente al 56,35% y al 50,66% de sus análogas de hidrolizados de leche cruda refrigerada y congelada, respectivamente. Precisamente, el HLC pasteurizada fue el que presentó una mayor concentración de péptidos hidrofóbicos y un mayor ratio de péptidos HO/HI, siendo los péptidos con residuos hidrofóbicos los que han demostrado mayor actividad IECA-I (Cheung *et al.*, 1980).

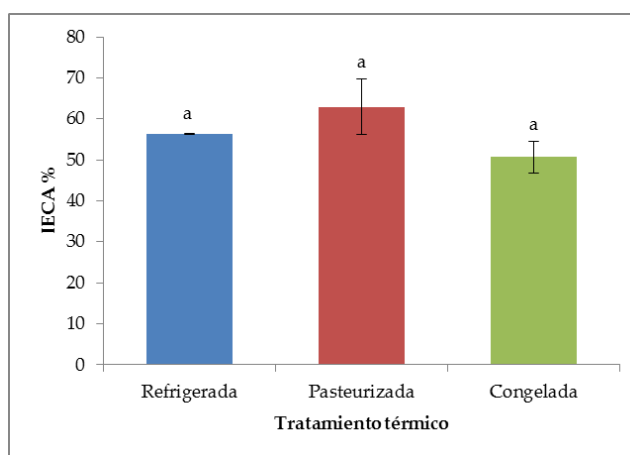


Figura IV. 61. Efecto del tipo de tratamiento térmico sobre la leche de cabra en la actividad IECA-I (%) de la fracción <3kDa de hidrolizados con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

No se han encontrado estudios sobre el efecto de los tratamientos térmicos de la leche en la bioactividad de hidrolizados de leche. Sin embargo, sí se han encontrado trabajos sobre el efecto del tratamiento térmico de la leche en la producción de péptidos bioactivos en quesos.

No se pueden equiparar nuestros resultados con los obtenidos en estudios en quesos, ya que hay que considerar que en la proteólisis de los quesos existen otros elementos a tener en cuenta que intervienen en la formación de péptidos, como los prolongados tiempos de maduración que permiten el desarrollo de la actividad de las bacterias endógenas y las enzimas proteolíticas presentes en la leche que son inactivadas con los tratamientos de pasteurización y esterilización. Al contrario que lo observado en nuestros hidrolizados, Silva *et al.* (2006)

describieron una mayor actividad IECA-I del extracto soluble en agua de queso de leche de cabra elaborado con leche cruda (63,43%) en comparación al elaborado con leche esterilizada (48%). De la misma manera, Pisanu *et al.* (2015) indicaron que los quesos elaborados con leche cruda de oveja rindieron una mayor concentración de péptidos con actividad IECA-I que los elaborados con leche pasteurizada.

IV.10.3. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad antioxidante y quelante del hierro (II) de la fracción <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L.

En la Tabla IV.55 y Figura IV.62, se presentan la actividad antioxidante frente a los radicales libres DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del hierro (II) de las fracciones <3kDa de los HLC obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L.

El tipo de tratamiento térmico influyó de forma significativa en la actividad captadora del radical DPPH ($P < 0,01$). La fracción <3kDa del HLC congelada mostró un mayor porcentaje de captación del DPPH• (81,25%) ($P \leq 0,05$) que sus análogas a partir de leche cruda refrigerada y pasteurizada (71,60 y 40,93%, respectivamente).

El tipo de tratamiento térmico no afectó de manera significativa en la captación del radical de ABTS de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra ($P > 0,05$). Aunque no se hayan presentado diferencias estadísticamente significativas, la fracción <3kDa del HLC congelada presentó un valor de IC_{50} más bajo (indicando mejor actividad) (8,74 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que sus análogas de los HLC cruda refrigerada y pasteurizada (9,25 y 9,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente).

El tipo de tratamiento térmico no afectó de forma significativa a la actividad quelante del hierro (II) de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra ($P > 0,05$). Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, la fracción <3kDa del HLC congelada fue la que presentó un valor de IC_{50} más bajo (21,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que las correspondientes a los HLC cruda refrigerada y pasteurizada (26,22 y 22,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente).

Tabla IV. 55. Efecto del tratamiento térmico de la leche de cabra en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del Fe²⁺ de las fracciones <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolymus* L. (Valores de medias y error estándar).

	Tratamiento térmico			P
	Refrigerada (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Congelada (n=3)	
RSA DPPH (%)	71,60 ± 5,35 _b	40,93 ± 1,34 _a	81,25 ± 0,10 _c	≤0,01
RSA DPPH (μMEq Trolox/mg)	14,50 ± 1,01 _b	8,83 ± 0,66 _a	17,20 ± 0,21 _c	≤0,01
RSA ABTS•+ (IC₅₀:μg/mL)	9,25 ± 1,20 _a	9,22 ± 0,60 _a	8,74 ± 0,30 _a	>0,05
RSA ABTS•+ (mMEq Trolox/mg)	3,19 ± 0,38 _a	3,13 ± 0,21 _a	3,28 ± 0,11 _a	>0,05
Quelante Fe²⁺ (IC₅₀:μg/mL)	26,22 ± 3,21 _a	22,17 ± 1,70 _a	21,92 ± 1,48 _a	>0,05

ANOVA: P: efecto del tratamiento térmico.

^{a,b,c}: Valores medios sin subíndices comunes son estadísticamente diferentes (Test LSD, P≤0,05).

La fracción <3kDa del HLC congelada mostró una considerable mejor actividad antioxidante frente al radical DPPH ($P < 0,01$). Respecto a la captación del radical ABTS•+ y la actividad quelante del hierro (II), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) pero en ambos casos la fracción <3kDa del HLC congelada mostró una ligera mejor actividad respecto a sus análogas de los HLC cruda refrigerada y pasteurizada. No se esperaban estos resultados dado que la fracción <3kDa de HLC congelada fue la que mostró el menor ratio de péptidos HO/HI, relacionándose habitualmente la presencia de péptidos hidrofóbicos con una mayor actividad antioxidante (Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

Por otra parte, la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra sometida a los distintos tratamientos térmicos presentaron diferencias entre la actividad de captación de los radicales libres DPPH• y ABTS•+, mostrando una mayor inhibición del radical de ABTS frente al del radical de DPPH (valores de TEAC de mM Eq Trolox *vs.* μM Eq Trolox). Como ya se ha comentado, estas diferencias se deben principalmente a la distinta solubilidad de los radicales en el medio, siendo el radical DPPH soluble en solventes orgánicos a diferencia del ABTS•+ que se solubiliza tanto en agua como en medio orgánico (Arnao, 2000).

No se han encontrado estudios sobre el efecto de tratamientos térmicos de la leche en obtención de hidrolizados con actividad antioxidante y quelante del

hierro (II). Sin embargo, en trabajos realizados sobre quesos elaborados con leche cruda o sometida a tratamiento térmico (pasteurización y esterilización) no se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante de los péptidos obtenidos (Pisanu *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2006).

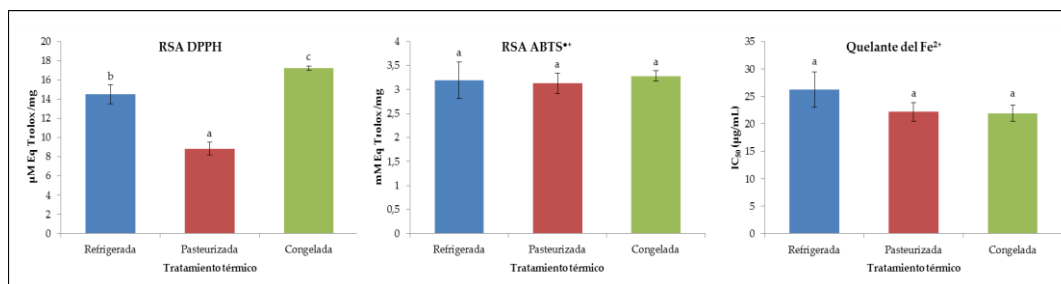


Figura IV. 62. Efecto del tratamiento térmico de la leche de cabra en la capacidad de captación de radicales libres (RSA) frente a DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante del Fe²⁺ de las fracciones <3kDa de los hidrolizados con extracto de flor de *C. scolyms* L. (Valores de medias y barras de error estándar. Medias con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)).

IV.10.4. Efecto de los tratamientos térmicos en la leche de cabra en la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolyms* L.

El efecto de los hidrolizados de leche de cabra totales así como el de sus fracciones <3kDa obtenidos con proteinasas de flor de alcachofa a partir de leche cruda refrigerada, pasteurizada o congelada sobre los parámetros de crecimiento bacteriano, fase lag, velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, se muestran en la Tabla IV.56.

No se observó efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en ninguno de los hidrolizados o sus fracciones <3kDa sobre los microorganismos tanto Gram negativos (*E. faecalis* y *E. coli*) como Gram positivos (*L. innocua* y *P. fluorescens*) testados.

No se han encontrado estudios sobre el efecto del tratamiento térmico de la leche en la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana. Sin embargo, en un trabajo realizado sobre quesos de leche de oveja elaborados con leche cruda o pasteurizada no se identificaron diferencias en la actividad antimicrobiana potencial de los péptidos obtenidos (Pisanu *et al.*, 2015).

Tabla IV. 56. Efecto en los parámetros de crecimiento bacteriano de los hidrolizados de leche de cabra obtenidos a partir de leche sometida a distintos tratamientos térmicos. (Valores de medias y error estándar).

Especie	Tamaño	Parámetros	Control	Tratamientos térmicos		
				Refrigerada (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Congelada (n=3)
<i>E. faecalis</i>	HT	Lag	599,57 ± 13,6	439,94 ± 10,1 ^{>>}	448,11 ± 17,5 ^{>>}	396,9 ± 16,9 ^{>>}
		Velocidad	2,83 ± 0,3	1,63 ± 0,1	2,03 ± 0,1	1,41 ± 0,1
		Cto. máx	0,479 ± 0,01	0,670 ± 0,02 ^{>>}	0,719 ± 0,01 ^{>>}	0,666 ± 0,02 ^{>>}
	<3kDa	Lag	599,57 ± 13,6	676,34 ± 36,5	622,85 ± 67,7	584,20 ± 36,2
		Velocidad	2,83 ± 0,3	3,42 ± 0,7	3,48 ± 0,7	1,83 ± 0,4
		Cto. máx	0,479 ± 0,01	0,520 ± 0,01	0,542 ± 0,03	0,480 ± 0,01
<i>E. coli</i>	HT	Lag	399,39 ± 15,0	400,01 ± 7,8	388,50 ± 8,8	398,99 ± 6,1
		Velocidad	1,86 ± 0,3	2,91 ± 0,2 ^{>>}	2,57 ± 0,2	3,00 ± 0,2 ^{>>}
		Cto. máx	0,623 ± 0,01	0,847 ± 0,01 ^{>>}	0,834 ± 0,02 ^{>>}	0,858 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	399,39 ± 15,0	402,77 ± 7,8	409,53 ± 5,4	392,91 ± 3,0
		Velocidad	1,86 ± 0,3	3,22 ± 0,1 ^{>>}	3,14 ± 0,1 ^{>>}	3,30 ± 0,1 ^{>>}
		Cto. máx	0,623 ± 0,01	0,871 ± 0,01 ^{>>}	0,879 ± 0,01 ^{>>}	0,872 ± 0,01 ^{>>}
<i>L. innocua</i>	HT	Lag	318,03 ± 1,9	276,31 ± 10,7 ^{>>}	291,27 ± 10,0	265,07 ± 5,3 ^{>>}
		Velocidad	1,31 ± 0,0	1,31 ± 0,1	1,42 ± 0,1	1,23 ± 0,0
		Cto. máx	0,268 ± 0,00	0,381 ± 0,01 ^{>>}	0,379 ± 0,02 ^{>>}	0,368 ± 0,01 ^{>>}
	<3kDa	Lag	318,03 ± 1,9	304,24 ± 4,9	303,32 ± 14,0	299,06 ± 5,0
		Velocidad	1,31 ± 0,0	1,62 ± 0,0 ^{>>}	1,53 ± 0,1	1,71 ± 0,0 ^{>>}
		Cto. máx	0,268 ± 0,00	0,276 ± 0,00	0,288 ± 0,02	0,304 ± 0,01
<i>P. fluorescens</i>	HT	Lag	438,96 ± 3,1	287,0 ± 60,4 ^{>>}	390,11 ± 18,2	334,90 ± 46,8
		Velocidad	1,24 ± 0,0	1,01 ± 0,2	1,21 ± 0,0	1,09 ± 0,1
		Cto. máx	0,670 ± 0,01	0,672 ± 0,04	0,810 ± 0,02	0,712 ± 0,06
	<3kDa	Lag	438,96 ± 3,1	442,48 ± 13,5	438,17 ± 22,9	478,51 ± 9,5
		Velocidad	1,24 ± 0,0	1,36 ± 0,0	1,30 ± 0,1	1,34 ± 0,1
		Cto. máx	0,670 ± 0,01	0,942 ± 0,03 ^{>>}	0,906 ± 0,04 ^{>>}	0,938 ± 0,03 ^{>>}

Test de Dunnett: >: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,05$); >>: Efecto positivo en el parámetro de crecimiento ($P \leq 0,01$). Cuando no aparecen superíndices no hubo efecto estadísticamente significativo ($P > 0,05$) del hidrolizado en el parámetro.

IV.11. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

La identificación de los péptidos presentes en las muestras se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS). Los espectros obtenidos se han analizado mediante su comparación con bases de datos de proteomas de referencia de las especies de origen de la proteína (vaca, cabra y gallina). Se ha obtenido además, una cuantificación relativa de los péptidos en cada muestra (PSMs). Para el análisis de los resultados se han normalizado los valores de la cuantificación para hacerlos comparables entre las muestras.

Las secuencias identificadas en las muestras se compararon con las recogidas en la base de datos de péptidos bioactivos BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008). Esta comparación permitió por un lado, la identificación de péptidos en los distintos hidrolizados cuyas secuencias íntegras han mostrado bioactividad, así como secuencias bioactivas dentro de la estructura primaria de los péptidos.

IV.11.1. Péptidos bioactivos en hidrolizados de caseína.

En las Tablas IV.57, IV.58 y IV.59 se presentan las secuencias de los péptidos que han demostrado tener actividad biológica identificados en los hidrolizados de caseína bovina obtenidos con extracto de flor de *C. scolyumus* L. a los tiempos de hidrólisis de 2, 4 y 16 horas.

Las secuencias de los péptidos identificadas comunes a los tres tipos de hidrolizados de caseína que han demostrado bioactividad son DAQSAPLRVY y RPKHPIKHQ con actividad IECA (IC_{50} : 13 μ M); PAAVRSPAQILQ y SDIPNPIGSENSEK con actividad antibacteriana; y RPKHPIKHQGLPQEVLENENLLRF con actividad antibacteriana e inmunomoduladora.

Tabla IV. 57. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 2 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AMKPWIQPK	7497/3395	2,278	α ₂ -CN bovina	1098,36	IECA	600 μ M
ARHPHLSFM	7797	2,278	β -CN y κ -CN bovinas	1329,54	Antioxidante	–
DAQSAPLRVY	9112	2,278	β -Lg bovina	1119,23	IECA	13 μ M
FFVAPFPEVFGK	7800	2,278	α ₁ -CN bovina	1384,63	IECA	18 μ M
8311	8311				Anticancerígena	–
PAAVRSQAQILQ	8271	4,556	f(64-75) κ -CN bovina	1250,45	Antibacteriana	–
RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR*	3055	0,905	fosfopéptido f(1-25) β -CN bovina	2803,03	Immunomoduladora	–
RPKHPIKHQ*	7483	0,905	f(1-9) α ₁ -CN bovina	1140,35	IECA	13 μ M
3035	3035	0,905	Istracidina / f(1-23) α ₁ -CN bovina	2764,22	Antibacteriana	–
8171	8171				Immunomoduladora	–
SDIPNPIGSENSEK	8335	2,278	f(195-208) α ₁ -CN bovina	1486,55	Antibacteriana	–
VKEAMAPK	7796	2,278	β -CN bovina	873,07	Antioxidante	–

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total, y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 58. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 4 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AMKPPWQPK	7497/3395	1,082	α ₂ -CN bovina	1098,36	IECA	600 μ M
DAQSAPLRVY	9112	1,082	β -Lg bovina	1119,23	IECA	13 μ M
FFVAPFPEVFGK*	7800 8311	0,816	α ₁ -CN bovina	1384,63	IECA Anticancerígena	18 μ M -
KVLPVPQK	7876	1,082	f(169-176) β -CN bovina	908,14	Antioxidante	-
LLYQEPVLGPRGPFPIIV*	8174	0,816	f(1-28) β -CN bovina	2107,55	Inmunomoduladora	-
NLHLPPLL*	8315	0,816	β -CN bovina	1029,28	Anticancerígena	-
PAAVRSPAQILQ	8271	2,165	f(64-75) κ -CN bovina	1250,45	Antibacteriana	-
RELEELNVPGEIVESLSSSESITR*	3055	0,816	fosfopéptido f(1-25) β -CN bovina	2803,03	Inmunomoduladora	-
RPKHPKHKQ	7483	1,082	f(1-9) α ₁ -CN bovina	1140,35	IECA	13 μ M
RPKHPKHKQGLPQEVLENLLRF	8171 3035	4,894	Istracídina/ (f1-23) α ₁ -CN bovina	2764,22	Inmunomoduladora Antibacteriana	- -
SDIPNPIGSENSEK	8335	1,082	f(195-208) α ₁ -CN bovina	1486,55	Antibacteriana	-
TPVVVPPFLQP*	3503	0,816	f(80-90) β -CN bovina	1193,44	IECA	749 μ M
VENLHLPPLL	8317	1,082	β -CN bovina	1257,53	Anticancerígena	-
VLNENLLR	8334	1,082	f(30-37) α ₁ -CN bovina	970,13	Antibacteriana	-
VYPPFPGPIH*	2614	0,816	β -CN bovina	1026,18	Antiamnésica	110 μ M

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 59. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de caseína bovina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AMKPWIQPKTKVIPYVRYL*	3030	0,485	α _{S2} -CN bovina	2331,87	Unión a la calmodulina	-
DAQSAPLRVY	9112	0,971	β-Lg bovina	1119,23	IECA	13 μM
GPVVRGPFPII	8286 8169	0,740	β-CN bovina	1052,27	Antioxidante IECA	- -
KVLPVPQK*	7876	0,485	f(169-176) β-CN bovina	908,14	Antioxidante	-
LLYQEPVLGVRGPFPII*	8174	0,971	f(1-28) β-CN bovina	2107,55	Inmunomoduladora	-
MAIPKKNQDK*	3292 2796	0,485	f(106-116) κ-CN bovina	1269,52	Antitrombótica Inhibidora plaquetaria	- -
NLHLPPLL*	8315	0,971	β-CN bovina	1029,28	Anticancerígena	-
PAAVRSPAQILQ	8271	2,961	f(64-75) κ-CN bovina	1250,45	Antibacteriana	-
RPKHPIKHQ	7483	3,398	f(1-9) α _{S1} -CN	1140,35	IECA	13 μM
RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF*	3035 8171	1,456	Isracidina/ f(1-23) α _{S1} -CN bovina	2764,22	Antibacteriana Inmunomoduladora	- -
SDIPNPIGSENSEK	8335	1,480	f(195-208) α _{S1} -CN bovina	1486,55	Antibacteriana	-
VENLHLPPLL	8317	0,740	β-CN bovina	1257,53	Anticancerígena	-
VYQHQAAMKPWIPYVRY*	3435	0,485	f(183-206) α _{S2} -CN bovina	3002,59	Hemolítica Antibacteriana	- -
VYQHQAAMKPWIPYVRY*	3033				Unión a la calmodulina	-
VYQHQAAMKPWIPYVRYL*	3034 3964	0,485	f(183-207) α _{S2} -CN bovina	3115,75	Unión a la calmodulina Hemolítica	- -
VYQHQAAMKPWIPYVRYL*	5469				Antibacteriana	-

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da)

Por otro lado, se han identificado péptidos no compartidos en cada una de las muestras. El hidrolizado de caseína de 2 horas de tiempo de hidrólisis se han identificado las secuencias: ARHPHPLSFM y VKEAMAPK con actividad antioxidante; en el hidrolizado de 4 horas se han identificado las secuencias: TPVVVPPFLQP con actividad IECA (IC_{50} : 749 μ M), VLNENLLR con actividad antibacteriana y VYFPFGPIH con actividad antiamnésica (IC_{50} :110 μ M); y en el de 16 horas se han identificado las secuencias AMKPWIQPKTKVIPYVRYL con capacidad de unión a la calmodulina, GPVRGPFPII con actividad antioxidante, MAIPPKKNQDK con actividad inhibidora plaquetaria y antitrombótica, VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY y VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL con capacidad de unión a la calmodulina y actividad hemolítica y antibacteriana.

Del mismo modo, otros autores han identificado secuencias de péptidos con bioactividad mediante la hidrólisis de caseínas bovinas con enzimas de origen vegetal, como por ejemplo las obtenidas en la hidrólisis de caseína bovina con peptidasas del látex de *Maclura pomifera*: YQEPVLGPVRGPFPIIV y RFFVAPFPE, que mostraron actividad IECA (Corrons *et al.*, 2017); o a partir de la hidrólisis de la β -caseína bovina con extracto de látex de *Ficus carica*, donde se identificaron los siguientes péptidos: DMPIQ, LPLPLL, VPYPQR, DKIHFA, GPFPIIV, KVLVPVQK, QPHQPLPPT y YFPFGPIPNS, a los que les atribuyeron una posible actividad sinérgica antioxidante (Di Pierro *et al.*,2014).

Por otra parte, entre los péptidos identificados en los hidrolizados de caseína con extracto de flor de *C. scolymus* L. se ha observado una posible actividad biológica putativa, ya que dentro de su estructura primaria se encuentran secuencias encriptadas que han demostrado actividad en otros estudios. En el gráfico de la Figura IV.63 se muestra la distribución de los péptidos con potencial actividad de los hidrolizados de caseína a los tres tiempos de hidrólisis agrupados según el tipo de actividad observada en fragmentos de sus secuencias.

El tiempo de hidrólisis de 4 horas fue el que rindió una mayor cantidad de péptidos con actividad potencial, destacando la actividad IECA, antioxidante, inhibidora de la dipeptidil peptidasa IV, estimulante, antitrombótica, opioide e inmunomoduladora. De hecho, en el análisis de la bioactividad *in vitro* de los hidrolizados de caseína bovina, el hidrolizado total de cuatro horas mostró la mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH ($5,55 \pm 0,61$ Eq μ M

Trolox/mg péptidos) y mayor actividad quelante del hierro (II) (IC₅₀: 188,33 µg/mL), además su fracción de peso molecular <3kDa fue la que presentó mayor porcentaje de inhibición de la ECA (66,86%).

El hidrolizado de 2 horas destacó por su potencial actividad antiamnésica, anticancerígena, agonista opioide, anorexígena y quimiotáctica. Y por último, el hidrolizado de 16 horas llama la atención por su mayor actividad potencial de ligando de la permeasa bacteriana, actividad hipotensora, quelante y hemolítica.

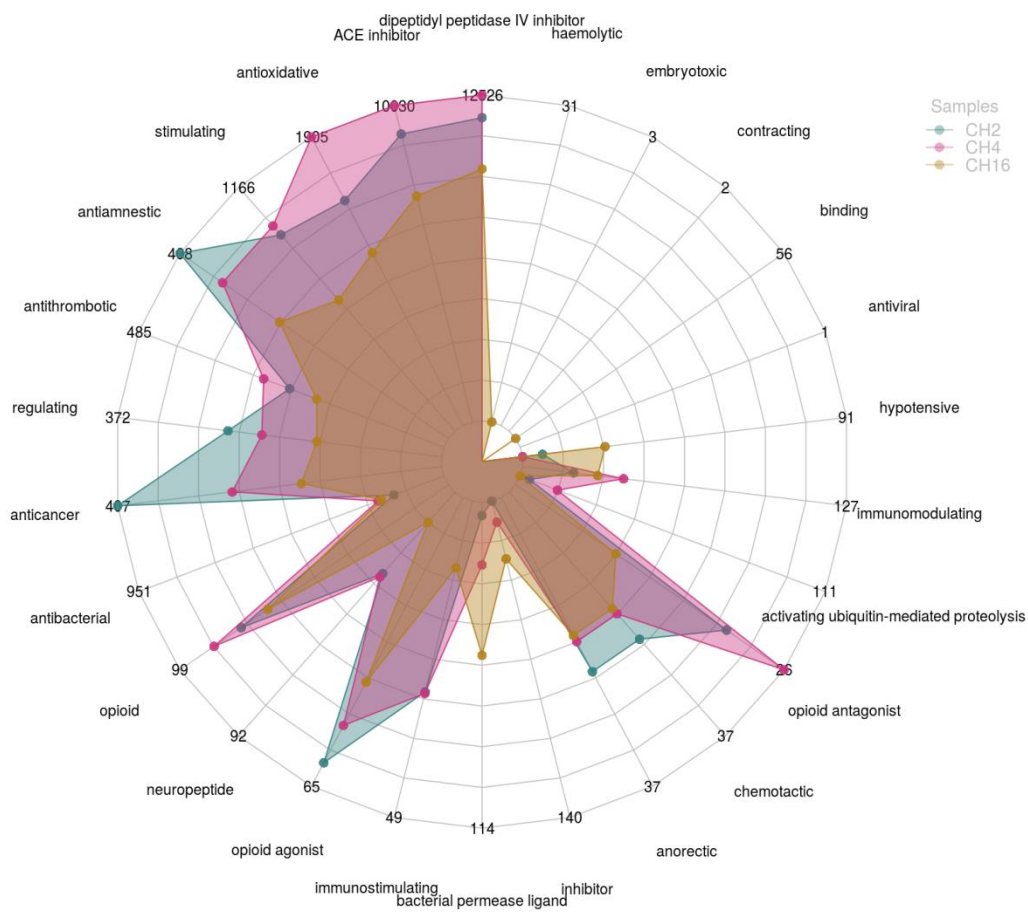


Figura IV. 63. Actividad potencial de los péptidos de los hidrolizados de caseína obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. de tiempo de hidrólisis de dos horas (CH2), de cuatro horas (CH4) y de dieciséis horas (CH16).

IV.11.2. Péptidos bioactivos en hidrolizados de ovoalbúmina.

Las secuencias de los péptidos presentes en las muestras de hidrolizados de ovoalbúmina de 2, 4 y 16 horas de tiempo de hidrólisis obtenidos con extracto de flor de *C. scolymus* L. que han demostrado tener actividad biológica se presentan en las Tablas IV.60, IV.61 y IV.62, respectivamente.

Las secuencias de los péptidos identificadas comunes a los tres tipos de hidrolizados de ovoalbúmina (2, 4 y 16 horas) que han demostrado bioactividad son IAAEVYEHTEGSTTSY con actividad antioxidante, e YAEERYPIL con actividad IECA (IC_{50} : 4,7 μ M).

Tabla IV. 60. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 2 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC_{50}
IAAEVYEHTEGSTTSY	8232	11,094	Ovotransferrina	1757,81	Antioxidante	–
PIAAEVYEHTEGSTTSY	8231	1,585	Ovotransferrina	1854,93	Antioxidante	–
YAEERYPIL	7664/8391	11,094	Ovoalbúmina	1153,28	IECA	4,7 μ M

ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 61. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 4 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC_{50}
HLFGPPGKKDPV	8393	1,026	Ovotransferrina	1291,50	IECA	–
IAAEVYEHTEGSTTSY	8232	6,154	Ovotransferrina	1757,81	Antioxidante	–
YAEERYPIL	7664/8391	11,282	Ovoalbúmina	1153,28	IECA	4,7 μ M

ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 62. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
IAAEVYEHTEGSTTSY	8232	1,732	Ovotransferrina	1757,81	Antioxidante	–
YAEERYPIL	7664/8391	5,195	Ovoalbúmina	1153,28	IECA	4,7 μM

ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Por otro lado, se han identificado péptidos no compartidos en las muestras de 2 y 4 horas de hidrólisis. En hidrolizado de ovoalbúmina de 2 horas se ha identificado la secuencia PIAAEVYEHTEGSTTSY con actividad antioxidante; y en el hidrolizado de 4 horas se ha identificado la secuencia HLFGPPGKKDPV con actividad IECA.

En la bibliografía también se han identificado un gran número de péptidos con múltiples actividades biológicas *in vitro* a partir de proteína de clara de huevo. Ejemplos de ello son: el péptido WESLSRLLG obtenido de la hidrólisis de proteína de clara de huevo de avestruz con pepsina y pancreatina que demostró actividad de captación de radicales libres e IECA (IC₅₀: 47,6 μg/mL) (Assodeh *et al.*, 2016); los péptidos FRADHPFL, RADHPFL, YAEERYPIL, YRGGLEPINF, ESIINF, RDILNQ, IVF, YQIGL, SALAM, FSL, obtenidos de la hidrólisis de clara de huevo de gallina con pepsina que han demostrado actividad IECA, antioxidante, vasodilatadora y antihipertensiva (Garcés-Rimón *et al.*, 2016); y los péptidos DHTKE, FFGFN y MPDAHL con actividad antioxidante, procedentes de la hidrólisis de proteína de clara de huevo con alcalasa (Liu *et al.*, 2015). Precisamente, la secuencia YAEERYPIL identificada en la hidrólisis de clara de huevo con pepsina (Garcés-Rimón *et al.*, 2016) también ha sido identificada en nuestros hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de alcachofa.

Por otra parte, en los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de flor de *C. scolymus* L. se han identificado péptidos con posible actividad biológica potencial, ya que dentro de su estructura primaria se han hallado secuencias encriptadas que han demostrado bioactividad. En la Figura IV.64 se muestra la distribución de los péptidos con actividad putativa presentes en los hidrolizados de ovoalbúmina a los tres tiempos de hidrólisis.

A todos los tiempos de hidrólisis se obtuvieron péptidos que contenían secuencias con diversas actividades potenciales. El tiempo de hidrólisis de cuatro horas fue el que rindió una mayor cantidad de péptidos con fragmentos con bioactividad, destacando en las actividades antioxidante, hipotensora, inhibidora de la dipetidil peptidasa IV, de activación de la proteólisis mediada por ubiquitina, estimulante, opioide y como neuropéptido.

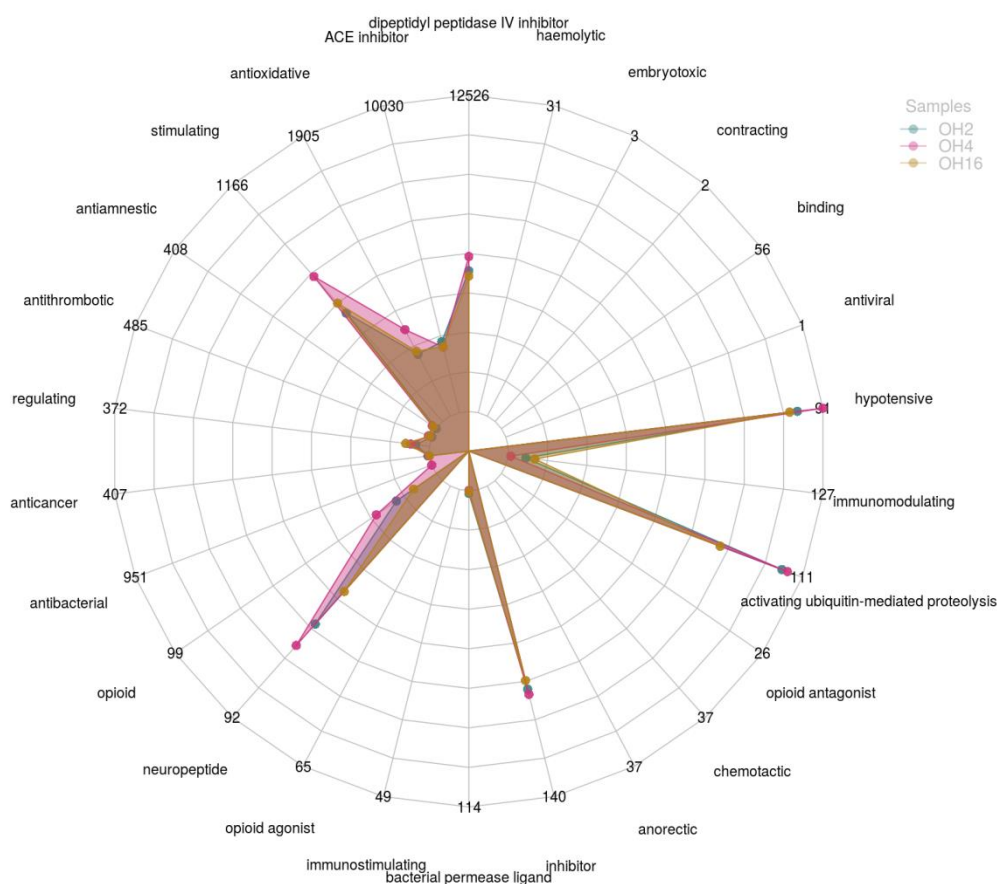


Figura IV. 64. Actividad potencial de los péptidos de los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. de tiempo de hidrólisis de dos horas (OH2), de cuatro horas (OH4) y de dieciséis horas (OH16).

Los gráficos de “tela de araña” que representan la actividad potencial de los péptidos identificados en los distintos hidrolizados a partir de los diferentes

sustratos (caseína bovina, ovoalbúmina y leche) comparten, para cada bioactividad representada, la misma escala y amplitud del eje entre las muestras, por lo que cada actividad potencial del hidrolizado es comparable con la de las otras muestras. En el caso de los hidrolizados de ovoalbúmina se puede observar que los péptidos identificados tienen una menor actividad potencial que los identificados a partir de los hidrolizados de caseína, los cuales destacan por su gran actividad potencial IECA, inhibidora de la DPP-IV, antioxidante, estimulante, antiamnésica, antitrombótica, anticancerígena, opioide, anorexígena y quimiotáctica, en comparación con los hidrolizados de ovoalbúmina que, únicamente destacan frente a los hidrolizados de caseína por su potencial actividad hipotensora y su potencial capacidad de activación de la proteólisis mediada por la ubiquitina.

IV.11.3. Péptidos bioactivos en hidrolizados de leche de vaca.

En las tablas IV.63 y IV.64 se presentan las secuencias de los péptidos que han demostrado tener actividad biológica identificados en las muestras de hidrolizados de vaca pasteurizada comercial con extracto de flor de *C. scolymus* L. y cuajo animal comercial a tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Las secuencias de los péptidos identificadas, que han demostrado bioactividad, comunes a los dos tipos de hidrolizados de leche de vaca pasteurizada son: AMKPWIQPKTKVIPYVRYL con capacidad de unión a la calmodulina, LLYQEPVLGPVRGPFPIIV con actividad inmunomoduladora y RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF con actividad inmunomoduladora y antibacteriana.

En el hidrolizado obtenido con extracto de flor de alcachofa se han identificado 18 péptidos que no se han encontrado en el hidrolizado obtenido con cuajo animal, destacando por su abundancia en PSMs el RPKHPIKHQ con actividad IECA (IC_{50} : 13 μ M), el KVLVPVQK con actividad antioxidante, el VYFFPGPIH con actividad antiamnésica y el VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY con actividad de unión a la calmodulina, hemolítica y antibacteriana.

Tabla IV. 63. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de vaca pasteurizada comercial con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AASDILLDAQSAPLR	8197	0,512	f(25-40) β-Lg bovina	1627,81	Antibacterina	–
AMKPWIQPK*	7497/3395	0,412	α ₂ -CN bovina	1098,363	IECA	600 μM
AMKPWIQPKTKVIPYVRYL*	3030	0,412	α ₂ -CN bovina	2331,873	Unión a la calmodulina	–
DAQSAPLRVY	9112	1,023	β-Lg bovina	1119,226	IECA	13 μM
FPEVFGK	7496	0,512	α ₁ -CN bovina	822,946	IECA	140 μM
KVLPVPQK	7876	1,235	f(169-176) β-CN bovina	908,139	Antioxidante	–
LDAQSAPLR	3977	1,023	ACE inhibitor	970,083	IECA	635 μM
LKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL*	8256/8337	0,412	f(180-207) α ₂ -CN bovina	3458,193	Antibacteriana	–
LLYQEPVLGPPVGRPFPIIV	8174	0,512	f(1-28) β-CN bovina	2107,553	Immunomoduladora	–
RPKHPIK	8164	1,023	f(1-7) α ₁ -CN bovina	875,072	Antibacteriana	–
RPKHPIKHQ	7483	5,761	f(1-9) α ₁ -CN bovina	1140,345	IECA	13 μM
RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	8171	5,761	Isracidina/ f(1-23) α ₁ -CN bovina	2764,223	Immunomoduladora	–
SDIPNPIGSENSEK	3035	0,412	f(195-208) α ₁ -CN bovina	1486,549	Antibacteriana	–
VKEAMAPK	7796	0,512	β-CN bovina	873,07	Antioxidante	–
VLENLLR	8334	0,512	f(30-37) α ₁ -CN bovina	970,125	Antibacteriana	–
VYPPFGPIH	2614	1,235	β-CN bovina	1026,1849	Antiarrítmica	110 μM
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPY*	3966	0,823	α ₂ -CN bovina	2584,103	Hemolítica	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	3033	1,235	f(183-206) α ₂ -CN bovina	3002,594	Unión a la calmodulina	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	3965	0,823	f(183-207) α ₂ -CN bovina	3115,7539	Hemolítica	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	3435	0,512	k-CN bovina	1038,189	Antibacteriana	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	3964	0,823	f(183-207) α ₂ -CN bovina	3115,7539	Hemolítica	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	3034	0,823	f(183-207) α ₂ -CN bovina	3115,7539	Unión a la calmodulina	–
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY*	5469	0,823	f(183-207) α ₂ -CN bovina	3115,7539	Antibacteriana	–
VYQKPAAVR	8397	0,512	k-CN bovina	1038,189	IECA	48,88 μM

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 64. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de vaca pasteurizada comercial con cuajo animal al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AMKPWQPKTKVIPYRYL	3030	6,780	α _{s2} -CN bovina	2331,87	Unión a la calmodulina	-
FFVAPFPEVFGK	8311 7800	1,695	α _{s1} -CN bovina	1384,63	Anticancerígena IECA	- 18 μM
KPWIQPKTKVIPYRYL	3031	1,695	α _{s2} -CN bovina	2129,60	Unión a la calmodulina	-
LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	8174	1,695	β-CN bovina	2107,55	Inmunomoduladora	-
RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	3055	1,695	fosfopéptido f(1-25) β-CN bovina	2803,03	Inmunomoduladora	-
RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK	8173	3,390	f(1-28) β-CN bovina	3158,47	Inmunomoduladora	-
RPKHPKHQGLPQEVLENLLRF	3035	69,492	Isracidina/ f(1-23) α _{s1} -CN bovina	2764,22	Antibacteriana	-
VKEAMAPK	8171 7796	22,222	β-CN bovina	873,07	Inmunomoduladora Antioxidante	- -

ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Por otro lado, en el hidrolizado de leche de vaca obtenido con cuajo animal se han identificado cinco péptidos que no se han encontrado en el hidrolizado obtenido con cinarasas, destacando entre ellos por su mayor abundancia en la muestra (22,22 PSMs) el VKEAMAPK con actividad inmunomoduladora y antioxidante.

En otros trabajos, se han identificado gran número de péptidos con múltiples actividades biológicas a partir de la hidrólisis de proteína de leche de vaca. Un ejemplo de péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis con una enzima de origen vegetal, la papaína, son: VKEAMPAK, VLPVPQ y AVPYPQR de la β -caseína con actividad antioxidante; el YFYPEL de la α_1 -caseína, con una gran capacidad de captación del anión superóxido; y el PYVRYL de la α_2 -caseína con actividad antioxidante (Ha *et al.*, 2015).

Otros péptidos obtenidos de la hidrólisis de leche de vaca con enzimas digestivas son: TTMLPW, MAIPPKK, RYLGY, AYFYPEL, YQKFPQY, PYVRYL, RRWQWRWQ y YGLF, que han demostrado actividad antihipertensiva en ratas (Contreras *et al.*, 2009; Hideaki *et al.*, 1990; Miguel *et al.*, 2007b; Nurminen *et al.*, 2000; Recio *et al.*, 2006; Ruiz-Giménez *et al.*, 2010); y VKEAMAPK y YFYPEL con actividad antioxidante (Suetsuna *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2001a).

Además, se han encontrado péptidos con actividad biológica potencial putativa, ya que fragmentos de su estructura primaria han demostrado bioactividad. En la Figura IV.65 se muestra la distribución de los péptidos con potencial actividad identificados en las fracciones de peso molecular <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca con extracto de flor de *C. scolymus* L. y con cuajo animal, agrupados según el tipo de actividad potencial observada.

Como se puede observar, la fracción <3kDa del hidrolizado de leche de vaca pasteurizada obtenido con extracto de flor de alcachofa presenta una mayor concentración de péptidos con fragmentos de secuencias bioactivas respecto a su homóloga obtenida con cuajo animal. A excepción de la capacidad de activación de la proteólisis mediada por ubiquitina y la actividad inmunoestimulante, la fracción de bajo peso molecular del hidrolizado obtenido con cinarasas presentó péptidos con más potencial bioactivo que la obtenida con cuajo animal.

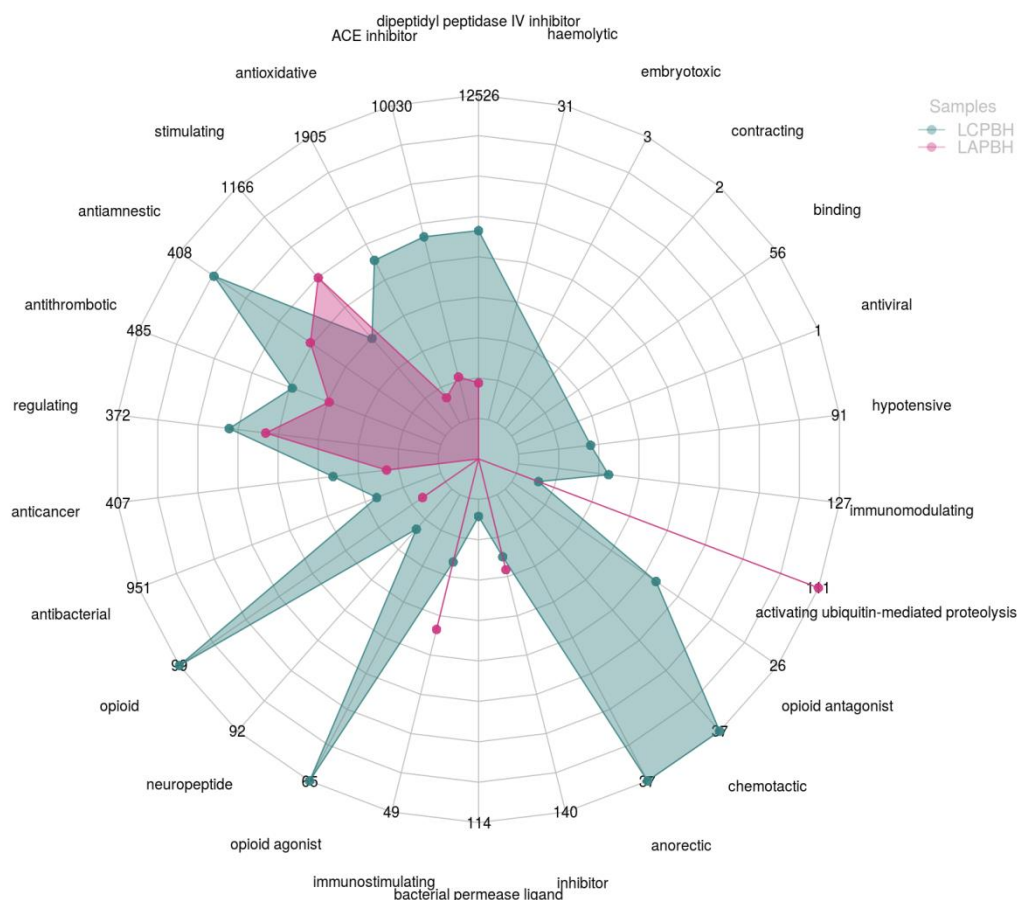


Figura IV. 65. Actividad potencial de los péptidos de la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de vaca pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. (LCPBH) y con cuajo animal (LAPBH).

IV.11.4. Péptidos bioactivos en hidrolizados de leche de cabra.

En las Tablas IV.65 y IV.66 se presentan las secuencias identificadas de los péptidos que poseen bioactividad presentes en las muestras de hidrolizados de leche de cabra pasteurizada, obtenidos con extracto de flor de *C. scolymsus* L. y cuajo animal comercial a tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Las secuencias de los péptidos identificadas, que han demostrado bioactividad, comunes a los dos tipos de hidrolizados de leche de cabra pasteurizada son: DAQSAPLRVY y LDAQSAPLR con actividad IECA (IC_{50} : 13 μ M y 635 μ M, respectivamente) y KVLFPVPQK con actividad antioxidante.

Tabla IV. 65. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra pasteurizada con extracto de flor de *C. scolyms* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AASDISLLDAQSAPLR	8197	0,424	β-Lg caprina	1627,81	Antibacteriana	–
ALPMHIR	3261	0,424	β-Lg caprina	837,04	IECA	43 μM
DAQSAPLRVY	9112	1,273	β-Lg caprina	1119,23	IECA	13 μM
KVLPVPQK	7876	8,910	β-CN caprina	908,14	Antioxidante	–
LDAQSAPLR	3977	0,424	β-Lg caprina	970,08	IECA	635 μM
VLDTDYK	3979	0,424	β-Lg caprina	852,92	IECA	946 μM
VLNENLLR*	8334	0,281	α ₁ -CN caprina	970,13	Antibacteriana	–

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 66. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal comercial al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
ALNEINQFYQK*	7805	0,494	α ₂ -CN caprina	1367,51	IECA	264 μM
DAQSAPLRVY	9112	3,125	β-Lg caprina	1119,23	IECA	13 μM
KVLPVPQK	7876	3,125	β-CN caprina	908,14	Antioxidante	–
LDAQSAPLR	3977	3,125	β-Lg caprina	970,08	IECA	635 μM

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

En el hidrolizado de leche de cabra pasteurizada obtenido con extracto de flor de *C. scolyms* L. se han identificado un mayor número de péptidos con bioactividad que en el hidrolizado obtenido con cuajo animal, al igual que ocurría en la leche de vaca. Cinco de los péptidos identificados en los hidrolizados de leche de cabra también se identificaron en el hidrolizado de leche de vaca obtenido con extracto de flor de alcachofa: AASDISLLDAQSAPLR, DAQSAPLRVY, KVLPVPQK, LDAQSAPLR y VLNENLLR. Los péptidos identificados sólo en el hidrolizado de leche de cabra con cinarasas fueron:

ALPMHIR y VLDTDYK, con actividad IECA (IC_{50} : 43 μ M y 946 μ M, respectivamente). En el hidrolizado de leche de cabra pasteurizada obtenido con cuajo animal se identificó el péptido ALNEINQFYQK con actividad IECA (IC_{50} : 246 μ M).

Por otra lado, también se han identificado péptidos en los hidrolizados de leche de cabra pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolyms* L y con cuajo animal que presentan dentro de su estructura primaria fragmentos de secuencia con bioactividad, y por lo tanto pueden ejercer una bioactividad putativa o potencial. En la Figura IV.66 se muestran los péptidos con actividad potencial de las fracciones <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra pasteurizada obtenidos con cinarasas y con cuajo animal.

Como se puede observar, la fracción <3kDa del hidrolizado obtenido a partir de extracto de flor de alcachofa presenta una mayor actividad potencial IECA, antioxidante, inhibidora de la DPP IV, antiamnésica, antitrombótica, anticancerígena, ligando de las permeasas bacterianas, antagonista opioide y como neuropéptido. La fracción <3kDa del hidrolizado de leche de cabra pasteurizada obtenido con cuajo animal destaca por sus péptidos con capacidad de activación de la proteólisis mediante ubiquitina, aunque también podrían ejercer una acción embriotóxica.

En comparación con la bioactividad potencial de los péptidos identificados de la hidrólisis de leche de vaca con extracto de flor de *C. scolyms*, los hidrolizados de leche de cabra mostraron en general una menor bioactividad potencial, destacando únicamente por poseer una mayor actividad potencial antitrombótica, hipotensiva y actividad de ligando de las permeasas bacterianas.

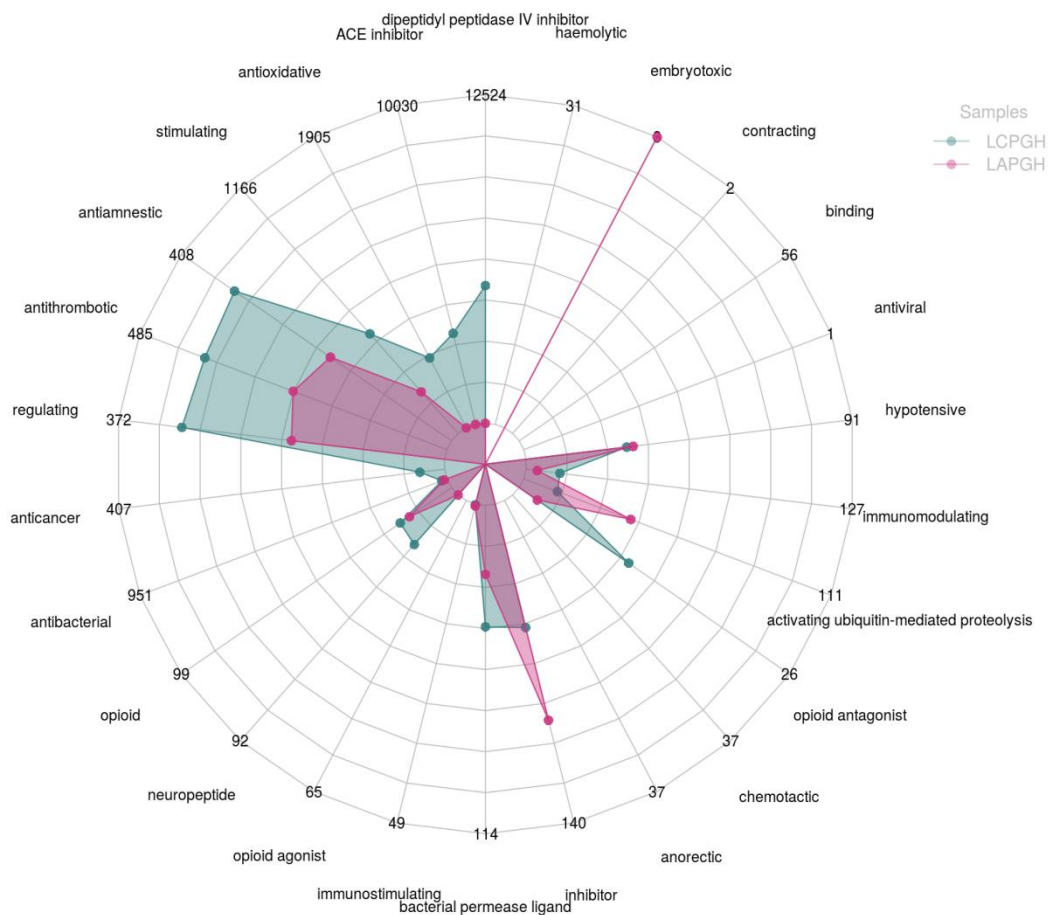


Tabla IV. 67. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra cruda refrigerada con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AASDISLLDAQSAPLR	8197	0,571	β-Lg caprina	1627,81	Antibacteriana	–
DAQSAPLRVY	9112	0,571	β-Lg caprina	1119,23	IECA	13 μM
KVLPVPQK	7876	6,857	β-CN caprina	908,14	Antioxidante	–
LDAQSAPLR	3977	1,143	β-Lg caprina	970,08	IECA	635 μM
VLNENLLR	8334	0,571	α ₁ -CN caprina	970,13	Antibacteriana	–
VLVLDTDYK	8198	0,571	β-Lg caprina	1065,21	Antibacteriana	–
	8622				Inhibidor DPP IV	424,4 μM
YQEPVLGP*	7879	0,514	β-CN caprina	902,00	Antioxidante	–

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

Tabla IV. 68. Secuencias de péptidos con bioactividad identificadas en el hidrolizado total y fracción <3kDa de leche de cabra congelada (-20°C durante 4 meses) con extracto de flor de *C. scolymus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas.

Secuencia	ID	PSMs	Proteína de origen	MM	Actividad	IC ₅₀
AASDISLLDAQSAPLR	8197	0,434	β-Lg caprina	1627,81	Antibacteriana	–
DAQSAPLRVY	9112	0,434	β-Lg caprina	1119,23	IECA	13 μM
KVLPVPQK	7876	16,653	β-CN caprina	908,14	Antioxidante	–
LDAQSAPLR	3977	0,434	β-Lg caprina	970,08	IECA	635 μM
VLNENLLR	8334	0,397	α ₁ -CN caprina	970,13	Antibacteriana	–

*: péptidos identificados únicamente en el hidrolizado total y no en la fracción <3kDa. ID: número de identificación de la secuencia en BIOPEP; PSMs: Cuantificación normalizada del número de espectros de fragmentación que coinciden con el péptido; MM: masa molecular del péptido (Da).

El hidrolizado de leche de cabra pasteurizada presentó dos péptidos distintos a los encontrados en las hidrólisis de la leche cruda refrigerada y congelada: ALPMHIR y VLDTDYK con actividad IECA (IC₅₀: 43 μM y 946 μM, respectivamente). Asimismo, en la hidrólisis de la leche de cabra cruda refrigerada también se han identificado dos péptidos que no se han encontrado en las otras muestras: el VLVLDTDYK con actividad antibacteriana e inhibidora de la DPP IV, y el YQEPVLGP con actividad antioxidante. Por otro lado, todos los

péptidos identificados en el hidrolizado de la leche de cabra congelada están presentes en los hidrolizados de la leche cruda refrigerada y pasteurizada.

En la literatura podemos encontrar numerosos ejemplos de péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis de proteínas de la leche de cabra. Se han identificado péptidos bioactivos a partir de hidrólisis enzimática de leche de cabra y oveja con extracto de flor de *C. cardunculus* L.: YQEP, VPKVK, YQEPVLGP-* de la β -caseína, así como RPK y RPKHPIKH-* de la α ₁-caseína, con actividad IECA; y YQEP-* de la β -caseína que ha mostrado actividad antioxidante (Silva *et al.*, 2006). También se han identificado péptidos con bioactividad de la hidrólisis de caseínas caprinas con papaína, tales como YAKPA, YAKPVA e INNQFLPYPY con propiedades antioxidantes, y GLDIQK y KAMKPWTQPKTNAIPYVRY con propiedades antihipertensivas (Bezerra *et al.*, 2013). Por otra parte, recientemente se han identificado tres nuevos péptidos: FPQ, AVPQ y NVPQ, con actividad IECA a partir de la digestión gastrointestinal *in vitro* de leche de cabra (Tagliacruzchi *et al.*, 2017).

Además, en los hidrolizados de leche de cabra obtenidos con extracto de *C. scolymus* L. se han encontrado péptidos que en su estructura primaria contienen secuencias encriptadas que han demostrado bioactividad. En la Figura IV.67 se muestra la distribución de dichos péptidos con actividad putativa hallados en las fracciones de peso molecular <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra y agrupados según el tipo de actividad potencial.

Como se puede observar, el hidrolizado de leche de cabra congelada fue el que dio lugar a un mayor número de péptidos con fragmentos de secuencias con bioactividad, presentando dicho hidrolizado más actividad potencial inhibidora de la DPP IV, IECA, antioxidante, estimulante, antiamnésica y antitrombótica que sus análogos a partir de leche cruda refrigerada y pasteurizada. No obstante, el hidrolizado de leche de cabra cruda refrigerada rindió péptidos con una mayor actividad potencial como neuropéptido, ligandos de las permeasas bacterianas e hipotensores; por último, el hidrolizado a partir de leche de cabra pasteurizada destacó por una mayor actividad potencial anticancerígena, opioide y antagonista opioide e inmunomoduladora.

Los distintos péptidos identificados en los hidrolizados indican que, a pesar de que no se han observado grandes diferencias en la bioactividad analizada *in*

in vitro, los tratamientos aplicados a la leche de cabra sí influyen en tipo de péptidos que se generan durante la hidrólisis con extracto de flor de alcachofa.

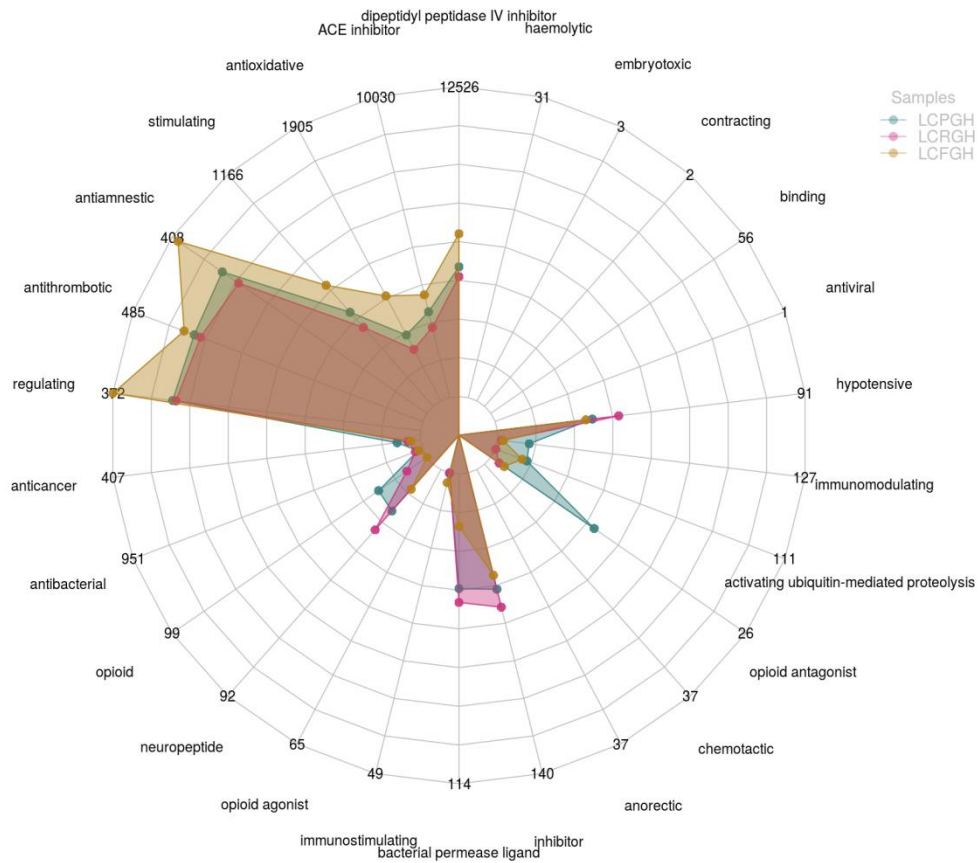
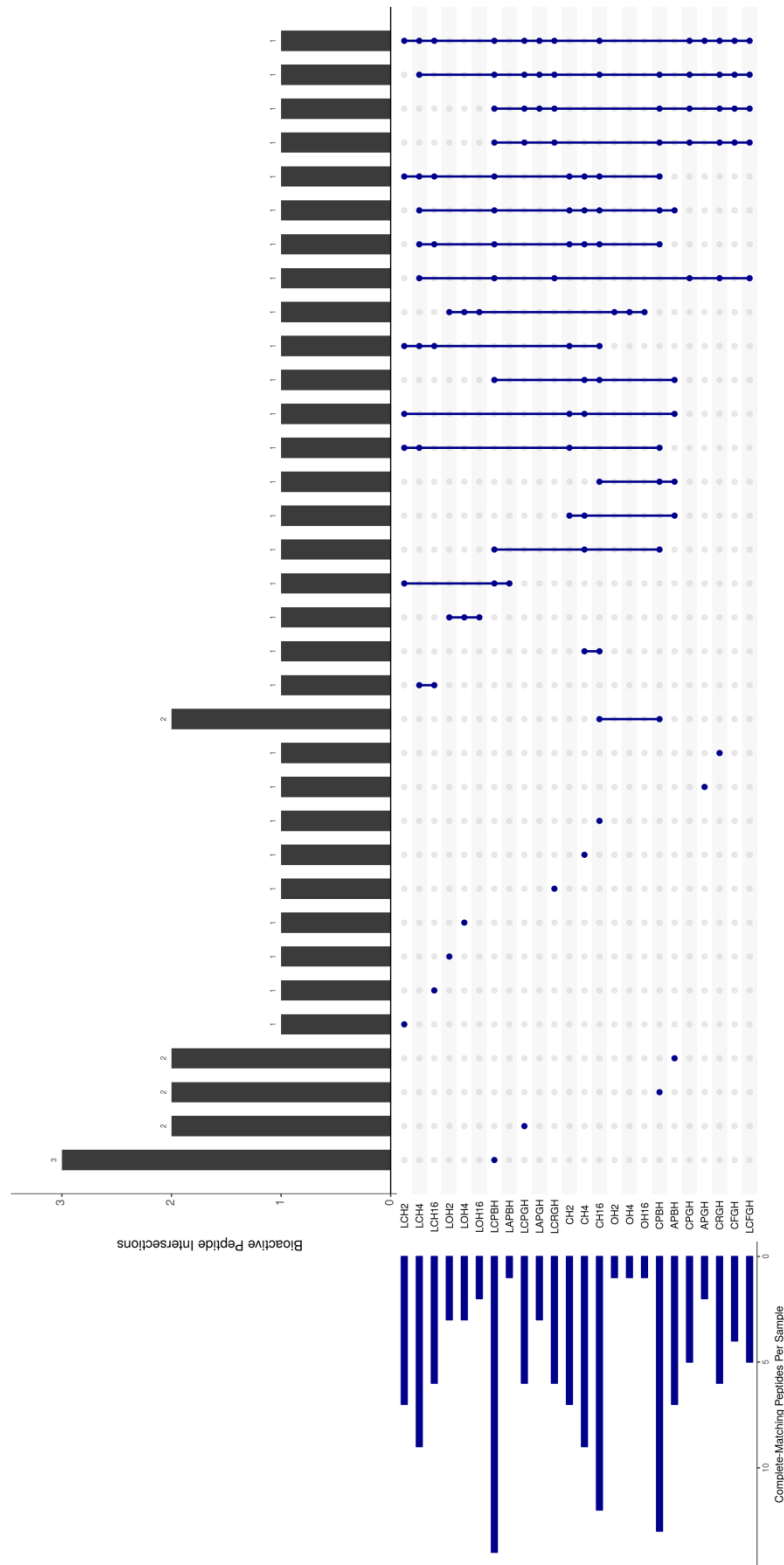


Figura IV. 67. Actividad potencial de los péptidos de la fracción <3kDa de los hidrolizados de leche de cabra cruda refrigerada (LCRGH) pasteurizada (LCPGH) y congelada (LCFGH) obtenidos con extracto de *C. scolymus* L.

IV.11.5. Estudio comparativo de los péptidos identificados en los hidrolizados de caseína, ovoalbúmina, leche de vaca y leche de cabra.

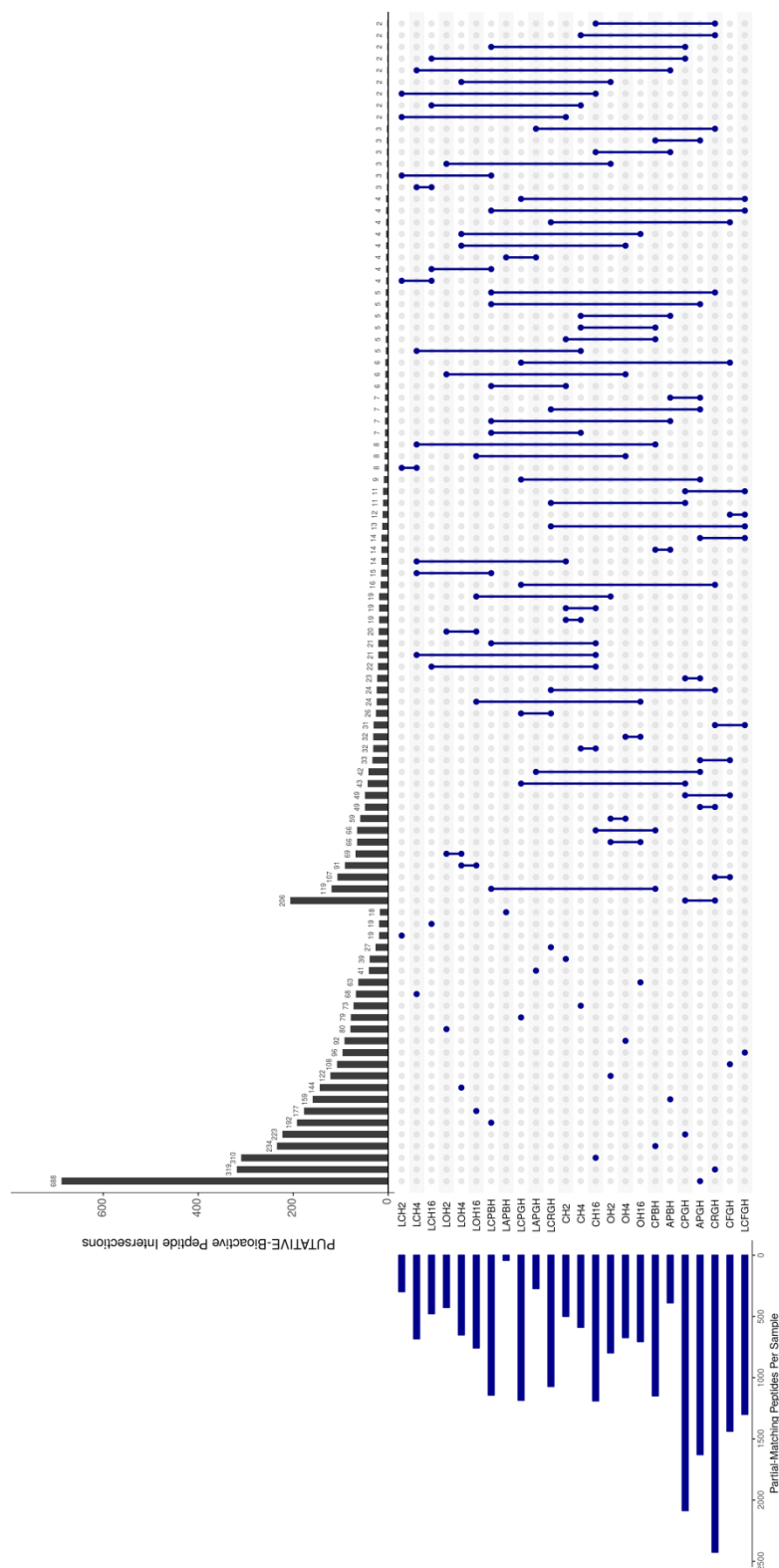
El estudio comparativo de los péptidos identificados entre las distintas muestras se ha llevado a cabo mediante la representación en gráficos de intersecciones de los péptidos que son comunes y no comunes a cada uno de los hidrolizados.

Los gráficos de intersecciones presentados indican, en el diagrama de barras horizontal situado en la parte izquierda del gráfico, el número de péptidos identificados en cada muestra. Por otra parte, el diagrama de barras vertical de la parte superior del gráfico indica el número de péptidos comunes entre las muestras, que a la vez se representan como puntos en la intersección de los dos diagramas. En la Figura IV.68 se muestra el gráfico de intersecciones de los péptidos bioactivos identificados en los hidrolizados, y en la Figura IV.69 se muestra el gráfico de intersecciones de los péptidos con actividad potencial (que incluyen en su estructura secuencias bioactivas) de los hidrolizados. Como se observa en el gráfico, las muestras donde se han identificado un mayor número de péptidos bioactivos son las correspondientes al hidrolizado total y la fracción <3kDa de leche de vaca pasteurizada con cinarasas (CPBH y LCPBH), siendo esta última la que ha presentado también un mayor número de péptidos no comunes (3) al resto de muestras. En la figura IV.69, se observa que las muestras donde se han identificado un mayor número de péptidos bioactivos putativos son las correspondientes a los hidrolizados de leche de cabra cruda (CRGH) y pasteurizada (CPGH) con cinarasas y al hidrolizado de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal (APGH), siendo éste último el que ha mostrado un mayor número de péptidos con actividad potencial no comunes al resto de las muestras (600).



(HT caseína (CH2, CH4, CH16) y F <3kDa (LCH2, LCH4, LCH16); HT *ovalbúmina* (OH2, OH4, OH16) y F <3kDa (LOH2, LOH4, LOH16); HT *leche de vaca* pasteurizada con extracto de *C. scolyimus* L. (CPBH) y F<3kDa (LCPBH); HT *de leche de vaca* pasteurizada con cuajo *animal* (APBH) y F<3kDa (LAPBH); HT *de leche de cabra* cruda, pasteurizada y congelada con extracto de *C. scolyimus* L. (CRGH, CPGH, CFGH) y F<3kDa (LCRGH, LCPGH, LCPBH); HT *de leche de cabra* pasteurizada con cuajo *animal* (APGH) y F<3kDa (LAPGH).

Figura IV. 68. Gráfico de intersecciones de los péptidos bioactivos identificados en los distintos hidrolizados.



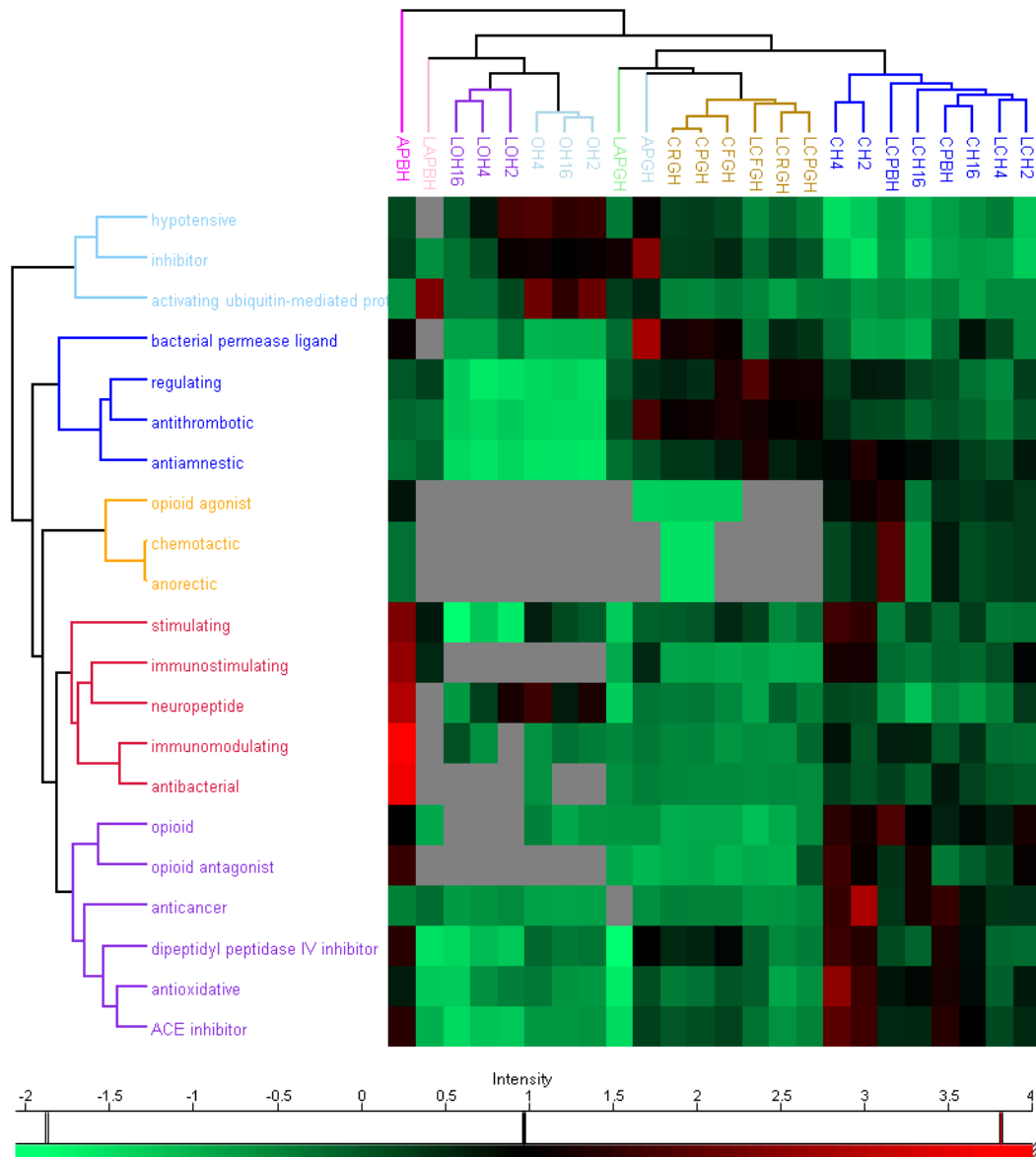
(HT caseína (CH2, CH4, CH16) y F <3kDa (LCH2, LCH4, LCH16); HT α lactalbúmina (OH2, OH4, OH16) y F <3kDa (LOH2, LOH4, LOH16); HT leche de vaca pasteurizada con extracto de *C. scolyimus* L. (CPBH) y F<3kDa (LCPBH); HT de leche de vaca pasteurizada con cuajo animal (APBH) y F<3kDa (LAPBH); HT de leche de cabra cruda, pasteurizada y congelada con extracto de *C. scolyimus* L. (CRGH, CPGH, CFCGH) y F<3kDa (LCRGH, LCPGH, LCFGH); HT de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal (APGH) y F<3kDa (LAPGH).

Figura IV. 69. Gráfico de intersecciones de los péptidos con fragmentos de secuencia con bioactividad identificados en los distintos hidrolizados.

En el gráfico de “heat map” (Figura IV.70) se agrupan las muestras según las actividades potenciales mayoritarias de los péptidos presentes. El nivel de intensidad de la actividad se representa mediante una escala de colores que va del verde (menor actividad) al rojo (mayor actividad) pasando por el negro. Las intersecciones en color gris indican que no se ha detectado dicha actividad en la muestra.

Destacan tres agrupaciones de las muestras según la actividad putativa de los péptidos identificados. Un grupo mayoritario corresponde a las muestras de caseína y leche de vaca pasteurizada hidrolizadas con extracto de flor de *C. scolyms* L.. Este grupo muestra una mayor actividad potencial IECA, antioxidante, opioide, anticancerígena e inhibidora de la dipeptidil peptidasa IV. El segundo grupo mayoritario estaría formado por los hidrolizados de leche de cabra con extracto de flor de *C. scolyms* L., que muestran una potencial actividad antitrombótica, reguladora del metabolismo e inhibidora de las permeasas bacterianas. El tercer grupo está constituido por los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de *C. scolyms* L. que muestran potencial actividad hipotensora, activadora de la proteólisis intracelular mediante la ubiquitina y como neuropéptidos.

La inclusión de este estudio de identificación de las secuencias y bioactividad asociadas a los hidrolizados, es un punto de partida para la profundización en el análisis de la actividad potencial de los péptidos obtenidos, aunque sería conveniente seguir trabajando en esta línea de investigación. El desarrollo de modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*, así como el estudio del grado de actividad biológica *in vivo* que presentan estos péptidos podrían ser los siguientes pasos a seguir en esta línea.



(HT caseína (CH2, CH4, CH16) y F <3kDa (LCH2, LCH4, LCH16); HT ovoalbúmina (OH2, OH4, OH16) y F <3kDa (LOH2, LOH4, LOH16); HT leche de vaca pasteurizada con extracto de *C. scolymus* L. (CPBH) y F <3kDa (LCPBH); HT de leche de vaca pasteurizada con cuajo animal (APBH) y F <3kDa (LAPBH); HT de leche de cabra cruda, pasteurizada y congelada con extracto de *C. scolymus* L. (CRGH, CPGH, CFGH) y F <3kDa (LCRGH, LCPGH, LCFGH); HT de leche de cabra pasteurizada con cuajo animal (APGH) y F <3kDa (LAPGH)).

Figura IV. 70. Agrupación de las muestras según la bioactividad potencial de los péptidos presentes identificados.

V - CONCLUSIONES

V - CONCLUSIONES

1. Las condiciones de hidrólisis de la caseína bovina para la obtención de péptidos con el extracto obtenido de flor de *C. scolymsus* L. estimadas como óptimas son: pH 6.2, temperatura de 50 °C, concentración del sustrato 10-12 mg/mL y concentración de proteína del extracto de 23 µg/mL, obteniéndose un valor de K_M de 5,66 mg/mL y una $V_{m\acute{a}x}$ de 8,47 mUAbs·min⁻¹.

2. Las condiciones de la hidrólisis de la ovoalbúmina para la obtención de péptidos con el extracto obtenido de flor seca de *C. scolymsus* L. estimadas como óptimas son: pH 6.2, temperatura de 36°C, concentración del sustrato 10-12 mg/mL y concentración de proteína del extracto de 221 µg/mL, obteniéndose un valor de K_M de 8,63 mg/mL y una $V_{m\acute{a}x}$ de 2,05 mUAbs·min⁻¹.

3. Los péptidos de caseína bovina obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. mostraron actividad inhibidora de la ECA-I, antioxidante y antibacteriana frente a *E. faecalis in vitro*. El tiempo de hidrólisis de 16 horas fue el que rindió hidrolizados con mayor concentración de péptidos y mayor bioactividad *in vitro*. Las fracciones de peso molecular <3kDa obtenidas al tiempo de hidrólisis de 16 horas mostraron mayor actividad inhibidora de la ECA-I y antioxidante que los hidrolizados totales. Se han identificado 15 péptidos bioactivos, destacando los que han demostrado actividad inhibidora de la ECA, antioxidante y antimicrobiana. También se han identificado un gran número de péptidos con actividad putativa que poseen fragmentos de secuencias bioactivas, destacando como mayor actividad potencial la inhibición de la ECA, la inhibición de la DDP-IV y la actividad antioxidante.

4. Los péptidos de ovoalbúmina obtenidos con extracto de flor de *C. scolymsus* L. mostraron actividad inhibidora de la ECA-I y antioxidante. No se observó actividad antimicrobiana. Las fracciones de peso molecular <3kDa demostraron mayor actividad inhibidora de la ECA-I y captadora del radical

DPPH a todos los tiempo de hidrólisis. Se han identificado 4 péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA y antioxidante. Al igual que en la caseína, se han identificado un gran número de péptidos con actividad putativa que poseen fragmentos de secuencias bioactivas, destacando como mayor actividad potencial, la inhibición de la ECA, la inhibición de la DDP-IV y la actividad antioxidante.

5. Los péptidos obtenidos de los hidrolizados de ovoalbúmina con extracto de *C. scolymsus* L. al tiempo de hidrólisis de 16 horas mostraron mayor actividad inhibidora de la ECA-I y antioxidante *in vitro* que los péptidos de los hidrolizados a partir de caseína bovina con extracto de *C. scolymsus* L. al mismo tiempo de hidrólisis.

6. Los péptidos de los hidrolizados de leche de vaca pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. presentaron actividad inhibidora de la ECA-I y antioxidante *in vitro*, siendo las fracciones de peso molecular <3kDa las que mostraron mayor actividad inhibidora de la ECA y captadora del radical DPPH. No se observó actividad antimicrobiana. Se han identificado 20 péptidos bioactivos destacando los que han demostrado actividad inhibidora de ECA y antibacteriana.

7. Los péptidos de los hidrolizados de leche de cabra pasteurizada obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. mostraron actividad inhibidora de la ECA-I y antioxidante *in vitro*, no presentando en general diferencias de bioactividad entre el hidrolizado total y su fracción <3kDa. No se observó actividad antimicrobiana. Se han identificado 7 péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA, antibacteriana y antioxidante. En ambos tipos de leche se identificaron un gran número de péptidos con actividad putativa que poseen la misma actividad potencial que la observada en los péptidos obtenidos de la hidrólisis de la caseína.

8. La especie de origen de la leche no afecta a la actividad inhibidora de la ECA-I de los hidrolizados. Sin embargo, los péptidos obtenidos a partir de la leche de vaca mostraron mayor capacidad antioxidante frente al DPPH y quelante del hierro (II) que los obtenidos a partir de la leche de cabra.

9. Los hidrolizados de leche pasteurizada de vaca y cabra obtenidos con extracto de *C. scolymsus* L. presentaron mayor concentración de péptidos y mayor actividad inhibidora de la ECA y antioxidante *in vitro* que los obtenidos con cuajo animal comercial. En ninguno se observó efecto antimicrobiano. En el hidrolizado con cuajo animal se ha identificado un menor número de péptidos (8) en comparación con el hidrolizado con flor de alcachofa (20), entre los que destacan los que presentan actividad inmunomoduladora. Además, el hidrolizado con flor de alcachofa presentó péptidos con mayor bioactividad potencial que el obtenido con cuajo animal.

10. La pasteurización y el almacenamiento en congelación de la leche de cabra afecta ligeramente a la bioactividad de sus hidrolizados. Así, los péptidos de leche de cabra pasteurizada presentan mayor actividad inhibidora de la ECA-I y menor actividad antioxidante frente al radical DPPH, que la leche cruda y congelada. Por otra parte, cuando la leche es almacenada en congelación los péptidos obtenidos presentan valores más altos en la captación del radical ABTS•+ y la actividad quelante del hierro (II). Se han identificado 9 péptidos con bioactividad, 5 de ellos comunes a las tres tipos de hidrolizados, 2 solamente identificados en los hidrolizados de leche cruda y otros 2 exclusivos en los de leche pasteurizada. La actividad potencial de los péptidos identificados también ha sido distinta en función del tratamiento que recibió la leche, siendo los hidrolizados de leche congelada los que presentaron mayor actividad potencial.

VI-BIBLIOGRAFÍA

VI - BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., y Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66, 91-98.
- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Aboueleinin, A. M., Kim, M., e Ibrahim, H. R. (2007). Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control*, 18(2), 173-178.
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Jo, C., Nam, K. C., y Ahn, D. U. (2014). Enzymatic hydrolysis of ovalbumin and the functional properties of the hydrolysates. *Poultry Science*, 93(10), 2678-2686.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., y Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3131-3138.
- Abuja, P. M., y Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306(1-2), 1-17.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry*, 141(3), 2269-2277.
- Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F., y Ehlers, M. R. W. (2003). Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(11), 891-902.

- Adzet, T., Camarasa, J., y Laguna, J. C. (1987). Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *Journal of Natural Products*, 50(4), 612-617.
- Afanas'ev, I. B., Dcrozko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., y Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38(11), 1763-1769.
- Agboola, S., Chen, S., y Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Dairy Science and Technology*, 84(6), 567-578.
- Agudelo, R. A., Gauthier, S. F., Pouliot, Y., Marin, J., y Savoie, L. (2004). Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(4), 325-332.
- Ageyi, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., y Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 244-256.
- Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., e Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80-88.
- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., y Nakamura, Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(4), 257-265.
- Akif, M., Georgiadis, D., Mahajan, A., Dive, V., Sturrock, E. D., Isaac, R. E., y Acharya, K. R. (2010). High-resolution crystal structures of *Drosophila melanogaster* angiotensin-converting enzyme in complex with novel

- inhibitors and antihypertensive drugs. *Journal of Molecular Biology*, 400(3), 502-517.
- Alfárez, M. J. M., Barrionuevo, M., Aliaga, I. L., Sanz-Sampelayo, M. R., Lisbona, F., Robles, J. C., y Campos, M. S. (2001). Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Science*, 64, 451-461.
- Alichanidis, E., Polychroniadou, A., Tzanetakis, N., y Vafopoulou, A. (1981). Teleme cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science*, 64(5), 732-739.
- Alonso, L., Juárez, M., Ramos, M., y Martín-Alvarez, P. J. (1987). Effects of changes during ripening and frozen storage on the physicochemical and sensory characteristics of Cabrales cheese. *International Journal of Food Science y Technology*, 22(5), 525-534.
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 235-262.
- Andreu, D., y Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, 47(6), 415-433.
- Anema, S. G., y McKenna, A. B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 422-428.
- Arihara, K. (2004). Functional foods. *Encyclopedia of meat sciences*, 1, 492-499.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74(1), 219-229.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., y Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic

- hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57(3), 319-324.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science y Technology*, 11(11), 419-421.
- Arruda, M. S., Silva, F. O., Egito, A. S., Silva, T. M. S., Lima-Filho, J. L., Porto, A. L. F., y Moreira, K. A. (2012). New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 73-79.
- Asoodeh, A., Homayouni-Tabrizi, M., Shabestarian, H., Emtenani, S., y Emtenani, S. (2016). Biochemical characterization of a novel antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 332-342.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., y Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Azuma, N., Suda, H., Iwasaki, H., Yamagata, N., Saeki, T., Kanamoto, R., y Iwami, K. (2000). Antitumorigenic effects of several food proteins in a rat model with colon cancer and their reverse correlation with plasma bile acid concentration. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46(2), 91-96.
- A.O.A.C. (1990). *Oficial methods of analysis*. Arlington, VA, U.S.A.: Association of Analytical Chemists.
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Fenteun, S., Dupont, D., y Rémond, D. (2013). The heat treatment and the

- gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, 136(3), 1203-1212.
- Baranyi, J., y Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4): 277-294.
- Baratzadeh, M.-H., Asoodeh, A., y Chamani, J. (2013). Antioxidant peptides obtained from goose egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science y Technology*, 48(8), 1603-1609.
- Becker, G. L. (1993). Preserving food and health: antioxidants make functional, nutritious preservatives. *Food Processing*, 12, 54-56.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., y Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, 182(2), 97-105.
- Belobrajdic, D. P., McIntosh, G. H., y Owens, J. A. (2003). Whey proteins protect more than red meat against azoxymethane induced ACF in Wistar rats. *Cancer Letters*, 198(1), 43-51.
- Berridge, N. J. (1952). Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst*, 77(911), 57-72.
- Berrocal, R., Chanton, S., Juillerat, M. A., Favillare, B., Scherz, J.-C., y Jost, R. (1989). Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 335-341.
- Bersuder, P., Hole, M., y Smith, G. (1998). Antioxidants from heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine

and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75(2).

- Bessin, Y., Saint, N., Marri, L., Marchini, D., y Molle, G. (2004). Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(2), 148-156.
- Bevilacqua, C., Martin, P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Roucayrol, A.-M., Pilla, F., y Heyman, M. (2001). Goats' milk of defective α_{s1} -casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs. *Journal of Dairy Research*, 68(02), 217-227.
- Bezerra, V. S., Campos, J. F., Silva, R. A. da, Porto, T. S., Filho, L., De, J. L., y Porto, A. L. F. (2013). Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) obtained by papain action. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(3), 513-520.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., y Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377-5392.
- Boelsma, E., y Kloek, J. (2008). Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *British Journal of Nutrition*, 101(6), 776-786.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., y Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118(3), 559-565.
- Bouhallab, S., y Bouglé, D. (2011). Mineral-binding peptides from food. *Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health*, 117.

- Bracquart, P., y Lorient, D. (1979). Etude des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus Thermophilus*. *Milchwissenschaft*, 32, 221-224.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brantl, V. (1984). Novel opioid peptides derived from human β -casein: human β -casomorphins. *European journal of pharmacology*, 106(1), 213-214.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Brooks, H., Lebleu, B., y Vivès, E. (2005). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4), 559-577.
- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S., y Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*, 16, 234-242.
- Calvarano, M., Postorino, E., Gionfriddo, F., Calvarano, I., Bovalò, F., y Calabro, G. (1996). Naringin extraction from exhausted bergamot peels. *Perfumer y flavorist*, 21(5), 1-4.
- Calvo, C.-F., Cesselin, F., Gelman, M., y Glowinski, J. (2000). Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration. *European Journal of Neuroscience*, 12(8), 2676-2684.
- Campos, R., Guerra, R., Aguilar, M., Ventura, O., y Camacho, L. (1990). Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chemistry*, 35(2), 89-97.

- Campos, M. S., López-Aliaga, I., Alférez, M. J., Nestares, T., y Barrionuevo, M. (2003). Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *British Journal of Nutrition*, 90(01), 61-67.
- Canabady-Rochelle, L. L. S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., y Girardet, J.-M. (2015). Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*, 183, 129-135.
- Carles, C., y Ribadeau-Dumas, B. (1984). Kinetics of action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine beta-casein. *Biochemistry*, 23(26), 6839-6843.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., y Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224-243.
- Carrera, E., Gaya, P., Medina, M., y Nuñez, M. (1999). Effect of milk coagulant on the formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of cows' milk Hispanico cheese. *Milchwissenschaft*, 54(3), 146-149.
- Castañeda-Casimiro, J., Ortega-Roque, J. A., Venegas-Medina, A. M., Aquino-Andrade, A., Serafín-López, J., Estrada-Parra, S., y Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, 18(1), 16-29.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., y Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3), 197-201.

- Cervato, G., Cazzola, R., y Cestaro, B. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(4), 291-296.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., y Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202.
- Chang, O. K., Seol, K.-H., Jeong, S.-G., Oh, M.-H., Park, B.-Y., Perrin, C., y Ham, J.-S. (2013). Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5544-5555.
- Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., y Rodríguez-López, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393-1400.
- Chen, Y.-C., Chang, H.-S., Wang, C.-T., y Cheng, F.-Y. (2009). Antioxidative activities of hydrolysates from duck egg white using enzymatic hydrolysis. *Asian-Australasian journal of animal science*, 22(11), 1587-1593.
- Chen, C., y Chi, Y.-J. (2011). Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 36(4), 383-394.
- Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y., y Lv, L. (2012a). Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*, 43(1), 457-466.
- Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y., y Xu, W. (2012b). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 27-34.

- Chen, M., y Li, B. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 16, 341-348.
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., y Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptides fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., y Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Chen, G.-W., Tsai, J.-S., y Sun Pan, B. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17(6), 641-647.
- Chen, S., Zhao, J., y Agboola, S. (2003). Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3127-3134.
- Cheng, F.-Y., Liu, Y.-T., Wan, T.-C., Lin, L.-C., y Sakata, R. (2008). The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Animal Science Journal*, 79(1), 122-128.
- Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., y Mao, X. Y. (2013). Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ -casein hydrolysate and its fractions. *International Dairy Journal*, 31(2), 111-116.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting

- enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407.
- Chiang, W.-D., Cordle, C. T., y Thomas, R. L. (1995). Casein hydrolysate produced using a formed-in-place membrane reactor. *Journal of Food Science*, 60(6), 1349-1352.
- Chiang, W. D., Tsou, M.-J., Weng, C.-H., y Tsai, T.-C. (2008). Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from egg white protein hydrolysates using a membrane reactor. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(2), 54-60.
- Chitpinyol, S., y Crabbe, M. J. C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4), 395-418.
- 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 Research International*, 34(2), 177-182.
- Choi, I., Jung, C., Choi, H., Kim, C., y Ha, H. (2005). Effectiveness of phosphopeptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food chemistry*, 93(4), 577-583.
- Christaki, E., Bonos, E., y Florou-Paneri, P. (2012). Nutritional and functional properties of Cynara crops (globe artichoke and cardoon) and their potential application: a review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(2), 64-70.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., y Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 217-246.
- Cinq-Mars, C. D., Hu, C., Kitts, D. D., y Li-Chan, E. C. Y. (2008). Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and

- cell transport of the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 410-419.
- Clare, D. A., Catignani, G. L., y Swaisgood, H. E. (2003). Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1239-1255.
- Clare, D. A., y Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science y Technology*, 11(7), 254-262.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 1033-1043.
- Clifford, M. N., y Walker, R. (1987). Chlorogenic acids-confounders of coffee-serum cholesterol relationships. *Food Chemistry*, 24(1), 77-80.
- Conidi, C., Cassano, A., y García-Castello, E. (2014). Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. *Water Research*, 48, 363-374.
- Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Estadística agraria de Murcia 2014-2015. Recuperado de: [https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c80\\$m22721,22746,1174](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c80$m22721,22746,1174)
- Contreras, M. del M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., y Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.

- Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., y Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolysates from a whey protein concentrate with thermolysin: optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 9-15.
- Conway, V., Gauthier, S. F., y Pouliot, Y. (2012). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 364-372.
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S., y Brodelius, P. E. (1994a). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, 92(4), 645-653.
- Cordeiro, M. C., Xue, Z.-T., Pietrzak, M., Salomé Pais, M., y Brodelius, P. E. (1994b). Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant molecular biology*, 24(5), 733-741.
- Corrêa, A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., y Segalin, J. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk casinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 247-254.
- Corredig, M., y Dalgleish, D. G. (1996). Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 441-449.
- Corrons, M. A., Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., López, L. M. I., y Bruno, M. A. (2012). Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 103-109.

- Corrons, M. A., Liggieri, C. S., Trejo, S. A., y Bruno, M. A. (2017). ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Research International*, 93, 8-15.
- Crabbe, M. J. C. (2004). Rennets: general and molecular aspects. En P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogand, y T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 19-46). Amsterdam: Elsevier.
- Cushman, D. W., y Cheung, H. S. (1971a). Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 250(1), 261-265.
- Cushman, D. W., y Cheung, H. S. (1971b). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
- Dalgleish, D. G., y Banks, J. M. (1991). The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, 46(2), 75-78.
- Dangin, M., Boirie, Y., Guillet, C., y Beaufrère, B. (2002). Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *The Journal of Nutrition*, 132(10), 3228S-3233S.
- Daniel, H., Vohwinkel, M., y Rehner, G. (1990). Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *The Journal of Nutrition*, 120(3), 252-257.
- Danley, D. E., y Geoghegan, K. F. (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *Journal of Biological Chemistry*, 263(20), 9785-9789.
- Dannenber, F., y Kessler, H.-G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53(1), 258-263.

- Datta-Roy, D. (1982). Effect of heating and freezing on the peptic proteolysis of cow milk. *Milchwissenschaft*, 37(8), 461-463.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., y López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- Davis, C., y Reeves, R. (2002). *High value opportunities from the chicken egg: A report for the Rural Industries Research and Development Corporation* (Vol. 094). Kingston, Australia: RIRDC.
- de Castro, R. J. S., Bagagli, M. P., y Sato, H. H. (2015). Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 1, 64-69.
- de Castro, R. J. S., y Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.
- De Gobba, C., Espejo-Carpio, F. J., Skibsted, L. H., y Otte, J. (2014a). Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal*, 39(1), 28-40.
- De Gobba, C., Tompa, G., y Otte, J. (2014b). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205-215.
- Di Pierro, G., O'Keeffe, M. B., Poyarkov, A., Lomolino, G., y FitzGerald, R. J. (2014). Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food Chemistry*, 156, 305-311.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., y Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of

growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21-38.

Donnelly, W. J., Carroll, D. P., O'Callaghan, D. M., y Walls, D. (1986). Genetic polymorphism of bovine chymosin. *Journal of Dairy Research*, 53(04), 657-664.

Donnelly, W. J., O'Callaghan, D. M., y Carroll, D. P. (1984). Multiple forms of calf prochymosin and chymosin. *Biochemical Society Transactions*, 12, 440-441.

Dziuba, B., y Dziuba, M. (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(1), 5-26.

Dziuba, J., Minkiewicz, P., Nałecz, D., y Iwaniak, A. (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Food / Nahrung*, 43(3), 190-195.

Eckert, E., Zambrowicz, A., Pokora, M., Polanowski, A., Chrzanowska, J., Szoltysik, M., Dabrowska, A., Rózanski, H., y Trziszka, T. (2013). Biologically active peptides derived from egg proteins. *World's Poultry Science Journal*, 69(02), 375-386.

Eckert, E., Zambrowicz, A., Pokora, M., Setner, B., Dąbrowska, A., Szoltysik, M., Szewczuk, Z., Polanowski, A., Trziszka, T., y Chrzanowska, J. (2014). Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *Journal of Proteomics*, 110, 107-116.

Epand, R. M., y Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1-2), 11-28.

- Erdmann, K., Cheung, B. W., y Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654.
- Espejo-Carpio, F. J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E. M., y Otte, J. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal*, 32(2), 175-183.
- Espejo-Carpio, F. J., García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Morales-Medina, R., Guadix, A., y Guadix, E. M. (2016). Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 54, 21-28.
- Esteve, C., Marina, M. L., y García, M. C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167, 272-280.
- FAOStat. (2017a). Cantidades de producción de alcachofas por país en el año 2014. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- FAOStat. (2017b). Datos de área de cultivos de alcachofa y rendimiento en España del año 2014. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- FAOStat (2017c). Datos del precio al productor nacional de alcachofa anuales del año 2015. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/PP>
- FAOStat. (2017d). Datos de producciones de alcachofa a nivel mundial del año 2014 Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- FAOStat. (2017e) Exportación de alcachofa a nivel mundial en el año 2013. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/TP>

- Fabbri, A., Serranti, S., y Bonifazi, G. (2014). Biochemical methane potential (BMP) of artichoke waste: The inoculum effect. *Waste Management y Research*, 32(3), 207-214.
- Farnaud, S., y Evans, R. W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular immunology*, 40(7), 395-405.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simoes, I., Andrade, R., Verissimo, P., Lin, X.-L., Tang, J., y Pires, E. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28724-28729.
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., y Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *Journal of dairy science*, 87(6), 1641-1674.
- Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., y Jacobsen, C. (2010a). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk. *Food Chemistry*, 123(4), 1081-1089.
- Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., y Jacobsen, C. (2010b). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 - Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123(4), 1090-1097.
- FDA (Food and Drug Administration). (2013). Grade "A", Pasteurized Milk Ordinance; 2013 revision. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Estados Unidos. Recuperado de: <http://www.idfa.org/docs/default-source/news-files/2013-pmo-final.pdf?sfvrsn=0>
- Fellows, P. J. (2009). Pasteurisation. En *Food Processing Technology. Principles and practice (Third edition)* (pp. 381-394). Elsevier.

- Feng, F., y Mine, Y. (2006). Phosvitin phosphopeptides increase iron uptake in a Caco-2 cell monolayer model. *International journal of food science y technology*, 41(4), 455-458.
- Ferreira, G., Nicolás, E., Festozo, E., Soares, M. J., Fontes, W., de Souza, M., y Maffud, E. (2012). Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: A new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein and Peptide Letters*, 19(6), 596-603.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Mota, M. V., Tavares, P., Pereira, A., Gonçalves, M. P., Torres, D., Rocha, C., y Teixeira, J. A. (2007). Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 17(5), 481-487.
- Fiat, A.-M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D., y Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 301-310.
- FitzGerald, R. J., y Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 33-37.
- Fitzgerald, R. J., y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., y Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S-988S.
- Fleming, I. (2006). Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circulation Research*, 98(7), 887-896.
- Folkers, G. (1994). *β -casomorphins and related peptides: Recent developments: V. Brantl and H. Teschemacher (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1994, ISBN 3-527-30038-4, SFr 164.-. Elsevier.*

- Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., y Martín-Hernández, M. C. (1994). Effect of freezing and frozen storage on the physicochemical, organoleptic and microbiological characteristics of a semi-hard ewes' milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 61(1), 133-142.
- Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J., y Carrondo, M. A. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27694-27701.
- 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. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(1), 27-34.
- Fujita, H., Sasaki, R., y Yoshikawa, M. (1995a). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59(12), 2344-2345.
- Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K., y Yoshikawa, M. (1995b). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16(5), 785-790.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., y Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836-5840.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., y Fernández-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory

- characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added value components from food waste conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26, 68-87.
- Galanakis, C. M. (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a view point of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 575-579.
- Galanakis, C. M., Schieber, A. (2014). Editorial. *Food Research International*, 65, 299-300.
- Garcés-Rimón, M., López-Expósito, I., López-Fandiño, R., y Miguel, M. (2016). Egg white hydrolysates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. *European Food Research and Technology*, 242(1), 61-69.
- García-Risco, M. R., Ramos, M., y López-Fandiño, R. (2002). Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. *International Dairy Journal*, 12(8), 679-688.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., y Maubois, J.-L. (2006a). Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Le Lait*, 86(2), 99-125.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., y Saint-Sauveur, D. (2006b). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323.
- Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-

- induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 144(2), 279-286.
- Gennaro, R., y Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), 31-49.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J., y Cross, M. L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 111-117.
- Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X., y Vulfson, E. N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(3), 162-183.
- Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., y Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384-394.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Hasan, F. M., Gill, T. A., y Aluko, R. E. (2013). Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International*, 52(1), 315-322.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898-3904.
- Gobbetti, M., Minervini, F., y Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.

- Gobbetti, M., Minervini, F., y Rizzello, C. G. (2007). Bioactive peptides in dairy products. En Y. H. H. S. Scientist (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing* (pp. 489-517). John Wiley & Sons, Inc.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., Angelis, M. D., Corsetti, A., y Cagno, R. D. (2002). Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223-239.
- Goff, H. D., y Sahagian, M. E. (1996). Freezing of dairy products. En L. E. Jeremiah (Ed.), *Freezing effects on food quality* (pp. 299-335). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Gomes, M. I. F. V., Bonassi, I. A., y Roça, R. de O. (1997). Características químicas, microbiológicas e sensoriais de leite de cabra congelado. *Food Science and Technology (Campinas)*, 17, 111-114.
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., y Alonso, J. L. (2014). Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9769-9782.
- Gómez-Ruiz, J. Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., y Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1061-1067.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., y Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8), 697-706.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., y Recio, I. (2007). Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk

- proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, 28(22), 4202-4211.
- Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I., y Belloque, J. (2004). 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(20), 6315-6319.
- Gong, D., Kalina, J., Bain, M. M., Wilson, P. W., y Dunn, I. C. (2009). Gallin: a new antimicrobial peptide from egg white. En *British Poultry Abstracts* (Vol. 5, pp. 8-9). Taylor y Francis.
- Gonnet, F., Lemaître, G., Waksman, G., y Tortajada, J. (2003). MALDI/MS peptide mass fingerprinting for proteome analysis: identification of hydrophobic proteins attached to eucaryote keratinocyte cytoplasmic membrane using different matrices in concert. *Proteome Science*, 1(1), 2.
- González de Llano, D., Polo, M. C., y Ramos, M. (1994). Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78, 1018-1024.
- Grappin, R., Rank, T. C., y Olson, N. F. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A Review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 531-540.
- Gu, Y., Majumder, K., y Wu, J. (2011). QSAR-aided *in silico* approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides. *Food Research International*, 44(8), 2465-2474.
- Guesdon B, Pichon L, y Tome D. (2006). Opioid peptide. En *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease* (pp. 367-376). Taylor and Francis.

- Guillani, Z., Huma, N., Sameen, A., y Shahid, M. (2015). Influence of storage temperatures on the quality of concentrated whey. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52(2), 527-532.
- Guo, H., Kouzuma, Y., y Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113(1), 238-245.
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., y Kindstedt, P. S. (1995). Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2336-2344.
- Ha, G. E., Chang, O. K., Han, G. S., Ham, J. S., Park, B.-Y., y Jeong, S.-G. (2015). Comparison of antioxidant activities of hydrolysates of domestic and imported skim milk powders treated with papain. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(3), 360-369.
- Hadden, J. W. (1991). Immunotherapy of human immunodeficiency virus infection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 107-111.
- Haenlein, G. F. W. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research1. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2097-2115.
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155-163.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., y Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, Part A, 71-80.
- Halliwell, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, 47(3), 410-418.

- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Hancock, R. E. W., y Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- Hartmann, R., Günther, S., Martin, D., Meisel, H., Pentzien, A.-K., Schlimme, E., y Scholz, N. (2000). Cytochemical model systems for the detection and characterization of potentially bioactive milk components. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 52(1), 61-85.
- Hartmann, R., y Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., y Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 767-771.
- He, R., Ju, X., Yuan, J., Wang, L., Girgih, A. T., y Aluko, R. E. (2012). Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, 49(1), 432-438.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A. C., y Pais, M. S. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405-1410.

- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., y Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*, 1049(1), 107–114.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., y Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., y Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38(2), 82–100.
- Hervé-Grépinet, V., Réhault-Godbert, S., Labas, V., Magallon, T., Derache, C., Lavergne, M., Gautron, J., Lalmanach, A. C., y Nys, Y. (2010). Purification and characterization of avian β -defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4401–4409.
- Hidalgo, M. E., Folmer Côrrea, A. P., Mancilla Canales, M., Joner Daroit, D., Brandelli, A., y Risso, P. (2015). Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocolloids*, 43, 510–520.
- Hideaki, K., Kunio, D., Shigeru, S., Hideyo, U., Ryuji, S., Umeji, M., y Shizume, T. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 96(2), 367–371.
- Hill, L. E., Gomes, C., y Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 86–93.

- Hipkiss, A. R., y Brownson, C. (2000). A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 747-753.
- Hirota, T., Ohki, K., Kawagishi, R., Kajimoto, Y., Mizuno, S., Nakamura, Y., y Kitakaze, M. (2007). Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: Contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertension Research*, 30(6), 489-496.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H., y Zhou, K. (2009). Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, 117(3), 438-443.
- Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A., Abbaszadegan, M.-R., Shahrokhbadi, K., y Nakhaie Moghaddam, M. (2015). An identified antioxidant peptide obtained from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysate shows wound healing properties. *Pharmaceutical Biology*, 53(8), 1155-1162.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., y Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062-1071.
- Houlihan, A. V., Goddard, P. A., Nottingham, S. M., Kitchen, B. J., y Masters, C. J. (1992). Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 187-195.
- Hsu, K.-C., Li-Chan, E. C. Y., y Jao, C.-L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126(2), 617-622.

- Huang, W., Chakrabarti, S., Majumder, K., Jiang, Y., Davidge, S. T., y Wu, J. (2010a). Egg-derived peptide irw inhibits TNF- α -induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 10840-10846.
- Huang, Q., Li, S., Teng, H., Jin, Y., Ma, M., y Song, H. (2015). Optimizing preparation conditions for angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of ovalbumin. *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 2193-2198.
- Huang, W.-Y., Majumder, K., y Wu, J. (2010b). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123(3), 635-641.
- Hyslop, D. B. (2003). Enzymatic coagulation of milk. En P. F. Fox y P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry – 1 Proteins* (pp. 839-878). Springer US.
- Hyslop, D. B., Richardson, T., y Ryan, D. S. (1979). Kinetics of pepsin-initiated coagulation of κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 566(2), 390-396.
- Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., y Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63-71.
- IDF. (1992). Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity. En *IDF standard* (Vol. 157). Bruselas, Bélgica: International Dairy Federation.
- Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., y Murakami, K. (1983). Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(24), 7405-7409.

- Iroyukifujita, H., Eiichiyokoyama, K., y Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65(4), 564-569.
- Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., y Masud, T. (2013). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 231-239.
- Ishikawa, S., Yano, Y., Arihara, K., e Itoh, M. (2004). Egg yolk phosvitin inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 68, 1324-1331.
- Islam, M. A., Devle, H., Comi, I., Ulleberg, E. K., Rukke, E.-O., Vegarud, G. E., y Ekeberg, D. (2017). *Ex vivo* digestion of raw, pasteurised and homogenised milk - Effects on lipolysis and proteolysis. *International Dairy Journal*, 65, 14-19.
- Jacob, M., Jaros, D., y Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- Jakovetić, S., Luković, N., Jugović, B., Gvozdrenović, M., Grbavčić, S., Jovanović, J., y Knežević-Jugović, Z. (2015). Production of antioxidant egg white hydrolysates in a continuous stirred tank enzyme reactor coupled with membrane separation unit. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 287-300.
- Jang, A., Jo, C., Kang, K.-S., y Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107(1), 327-336.
- Jang, A., y Lee, M. (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69(4), 653-661.

- Jao, C.-L., Huang, S.-L., y Hsu, K.-C. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. *BioMedicine*, 2(4), 130-136.
- Jauhiainen, T., y Korpela, R. (2007). Milk Peptides and Blood Pressure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 825S-829S.
- Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., y Korpela, R. (2005). *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *American Journal of Hypertension*, 18(12), 1600-1605.
- Je, J.-Y., Park, J.-Y., Jung, W.-K., Park, P.-J., y Kim, S.-K. (2005). Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry*, 90(4), 809-814.
- Jenssen, H., Hamill, P., y Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
- Jeon, Y.-J., Byun, H.-G., y Kim, S.-K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.
- Jiang, B., y Mine, Y. (2000). Preparation of novel functional oligophosphopeptides from hen egg yolk phosvitin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 990-994.
- Jiang, B., y Mine, Y. (2001). Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin: effect of molecular size on the calcium-binding properties. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(5), 1187-1190.
- Jiang, Z., Tian, B., Brodkorb, A., y Huo, G. (2010). Production, analysis and *in vivo* evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chemistry*, 123(3), 779-786.

- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A.-M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F., y Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. *European Journal of Biochemistry*, 158(2), 379-382.
- Jollès, P., y Caen, J. P. (1991). Parallels between milk clotting and blood clotting: opportunities for milk-derived products. *Trends in Food Science y Technology*, 2, 42-43.
- Jrad, Z., El Hatmi, H., Adt, I., Girardet, J.-M., Cakir-Kiefer, C., Jardin, J., Degraeve, P. Khorchani, T., y Oulahal, N. (2014). Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science y Technology*, 94(3), 205-224.
- Jung, W.-K., Mendis, E., Je, J.-Y., Park, P.-J., Son, B. W., Kim, H. C., Choi, Y. K., y Kim, S.-K. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94(1), 26-32.
- Jung, W.-K., Park, P.-J., Byun, H.-G., Moon, S.-H., y Kim, S.-K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., y Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Animal Science Journal*, 74(1), 53-58.
- Katayama, S., Ishikawa, S., Fan, M. Z., y Mine, Y. (2007). Oligophosphopeptides derived from egg yolk phosvitin up-regulate γ -glutamylcysteine synthetase and antioxidant enzymes against oxidative stress in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2829-2835.

- Katayama, S., Xu, X., Fan, M. Z., y Mine, Y. (2006). Antioxidative stress activity of oligophosphopeptides derived from hen egg yolk phosphovitin in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 773-778.
- Kaur, H., Garg, A., y Raghava, G. P. S. (2007). PEPstr: a de novo method for tertiary structure prediction of small bioactive peptides. *Protein and Peptide Letters*, 14(7), 626-631.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., y He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, 365(9455), 217-223.
- Khora, S. S. (2013). Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 5(3), 31-37.
- Kim, H.-H., y Jiménez-Flores, R. (1995). Heat-induced interactions between the proteins of milk fat globule membrane and skim milk. *Journal of Dairy Science*, 78(1), 24-35.
- Kim, S.-K., Byun, H.-G., Park, P.-J., y Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997.
- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., y Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31-38.
- Kim, J.-W., Lee, B. C., Lee, J.-H., Nam, K.-C., y Lee, S.-C. (2008). Effect of electron-beam irradiation on the antioxidant activity of extracts from *Citrus unshiu* pomaces. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(1), 87-91.
- Kim, C., Spano, J., Park, E.-K., y Wi, S. (2009). Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the

- antimicrobial peptides, magainin-2 and aurein-3.3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(7), 1482-1496.
- Kitts, D. D. (2005). Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science y Technology*, 16(12), 549-554.
- Kitts, D., y Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.
- Ko, J.-Y., Lee, J.-H., Samarakoon, K., Kim, J.-S., y Jeon, Y.-J. (2013). Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 113-120.
- Kobayashi, Y., Yamauchi, T., Katsuda, T., Yamaji, H., y Katoh, S. (2008). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(3), 310-312.
- Koike, H., Ito, K., Miyamoto, M., y Nishino, H. (1980). Effects of long-term blockade of angiotensin converting enzyme with captopril (SQ14,225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR. *Hypertension*, 2(3), 299-303.
- Kopelman, I. J., y Cogan, U. (1976). Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *Journal of Dairy Science*, 59(2), 196-199.
- Korhonen H, P. A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. En *Handbook of food products manufacturing—Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables* (pp. 5-37). John Wiley and Sons.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.

- Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829-843.
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., y Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8421-8431.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y., y Yasuda, M. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(6), 1278-1283.
- Kucukgergin, C., Aydin, A. F., Ozdemirler, G. O., Mehmetcik, G., Kocar-Toker, N., y Uysal, M. (2010). Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biological Trace Element Research*, 135, 264-274.
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., y Kumar, P. (2016a). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20-25.
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., y Kumar, P. (2016b). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science y Technology*, 96(3), 391-404.

- Kumar, R., Singhal, V., Sangwan, R.B., y Mann, B. (2010). Comparative studies on antioxidant activity of buffalo and cow milk casein and their hydrolysates. *Milchwissenschaft – Milk Science International*, 65, 287-290.
- Kusmann, M., y van Bladeren, P. (2011). The extended nutrigenomics– Understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes, and human host. *Frontiers in genetics*, 2, 21.
- Kustanovich, I., Shalev, D. E., Mikhlin, M., Gaidukov, L., y Mor, A. (2002). Structural requirements for potent *versus* selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16941-16951.
- Kütt, M. L., Malbe, M., y Stagsted, J. (2011). Nanostructure-assisted laser desorption/ionization (NALDI) for analysis of peptides in milk and colostrum. *Agronomy Research*, 9(Special Issue II), 415-420.
- Lafarga, T., y Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98(2), 227-239.
- Lahov, E., y Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Jiménez, J., Boza, J., y Xaus, J. (2004). Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39(4), 354-360.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., y Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131-144.

- Lee, N.-Y., Cheng, J.-T., Enomoto, T., y Nakano, Y. (2006). One peptide derived from hen ovotransferrin as pro-drug to inhibit angiotensin converting enzyme. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(1), 31-35.
- Lee, J. K., Hong, S., Jeon, J.-K., Kim, S.-K., y Byun, H.-G. (2009). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Bioresource Technology*, 100(21), 5255-5259.
- Lee, S.-H., Qian, Z.-J., y Kim, S.-K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.
- Lee, S. H., y Song, K. B. (2009a). Article isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(3), 290-294.
- Lee, S.-H., y Song, K. B. (2009b). Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry*, 44(3), 378-381.
- Leser, S. (2013). The 2013 FAO report on dietary protein quality evaluation in human nutrition: Recommendations and implications. *Nutrition Bulletin*, 38(4), 421-428.
- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H., y Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7), 469-486.
- Li, Y.-W., y Li, B. (2013). Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key

- sequence positions and their amino acid properties. *Journal of theoretical biology*, 318, 29-43.
- Li, Y.-W., Li, B., He, J., y Qian, P. (2011). Structure-activity relationship study of antioxidative peptides by QSAR modeling: the amino acid next to C-terminus affects the activity. *Journal of Peptide Science*, 17(6), 454-462.
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., y Su, J. (2013). Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4242-4251.
- Li, G.-H., Qu, M.-R., Wan, J.-Z., y You, J.-M. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(S1), 275-280.
- Li, B. B., Smith, B., y Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.
- Lilla, S., Mogna, G., y Addeo, F. (2005). Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5230-5238.
- Lin, S., Jin, Y., Liu, M., Yang, Y., Zhang, M., Guo, Y., Jones, G., Liu, J., y Yin, Y. (2013). Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field. *Food Chemistry*, 139(1-4), 300-306.
- Lindmark-Månsson, H., y Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 103-110.

- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. S., y Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 175, 258-266.
- Liu, J., Yu, Z., Zhao, W., Lin, S., Wang, E., Zhang, Y., Hao, H., Wang, Z., y Chen, F. (2010). Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 122(4), 1159-1163.
- Liu, M., Wang, Y., Liu, Y., y Ruan, R. (2016). Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review. *Food Research International*, 89, 63-73.
- Llorach, R., Espin, J. C., Tomás-Barberán, F. A., y Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3458-3464.
- Llorente, B. E., Brutti, C. B., y Caffini, N. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8182-8189.
- Llorente, B. E., Obregón, W. D., Avilés, F. X., Caffini, N. O., y Vairo-Cavalli, S. (2014). Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, 159, 55-63.
- López-Aliaga, I., Alférez, M. J. M., Barrionuevo, M., Nestares, T., Sampelayo, M. S., y Campos, M. S. (2003). Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2958-2966.

- López-Brea, M., y Alarcón, T. (1999). Péptidos de origen eucariótico con actividad antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 12, 300-309.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L., y Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait*, 87(4-5), 241-249.
- López-Expósito, I., y Recio, I. (2006). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1294-1305.
- López-Fandiño, R., Recio, I., y Ramos, M. (2007). Egg-protein-derived peptides with antihypertensive activity. En P. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, y R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 199-211). Springer Berlin Heidelberg.
- López-Molina, D., Navarro-Martínez, M. D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A. N., Chazarra, S., y Rodríguez-López, J. N. (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*, 66(12), 1476-1484.
- Lopresto, C. G., Petrillo, F., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., y Calabrò, V. (2014). A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology*, 137, 13-20.
- Lourenço, E., da Rocha, J. A., y Netto, F. M. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17(6), 632-640.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., y Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76, Part 1, 39-50.

- Lynch, P. B., y Kerry, J. P. (2000). Utilizing diet to incorporate bioactive compounds and improve the nutritional quality of muscle foods. *Antioxidants in muscle foods*, 455-480.
- MacDonald, R. S., Thornton, W. H., y Marshall, R. T. (1994). A cell culture model to identify biologically active peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *Journal of Dairy Science*, 77(5), 1167-1175.
- Macedo, A. C., Malcata, F. X., y Oliveira, J. C. (1993). The technology, chemistry, and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1725-1739.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., y Pires, E. M. (1996). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: Action on bovine α - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 42-47.
- Maeno, M., Yamamoto, N., y Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1316-1321.
- Maes, W., Van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J. M., Schrezenmeir, J., Van Oostveldt, P., y Huyghebaert, A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118(1-2), 105-109.
- Majumder, K., y Wu, J. (2010). A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. *Food Research International*, 43(5), 1371-1378.
- Majumder, K., y Wu, J. (2011). Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysate of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 126(4), 1614-1619.

- Mannheim, A., y Cheryan, M. (1990). Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science*, 55(2), 381-385.
- Manso, M. A., y López-Fandiño, R. (2003). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1686-1692.
- Manso, M. A., y López-Fandiño, R. (2004). κ -casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20(4), 329-355.
- Mao, X.-Y., Ni, J.-R., Sun, W.-L., Hao, P.-P., y Fan, L. (2007). Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 103(4), 1282-1287.
- Mao, X.-Y., Cheng, X., Wang, X., y Wu, S.-J. (2011). Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 126(2), 484-490.
- MAPAMA (2017a). Alcachofa. Recuperado de:
<http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=3889>
- MAPAMA (2017b). Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción de alcachofa, 2014. Recuperado de:
<http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2015/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=6&seccion=31>
- Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., y Frías, J. (2017). Bioactive peptides in fermented foods. En *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 23-47). Elsevier.

- Martin-Orue, C., Henry, G., y Bouhallab, S. (1999). Tryptic hydrolysis of κ -caseinomacropeptide: control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 173-180.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., y Suzuki, H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(9), 2557-2561.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., y Suzuki, H. (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(5), 1405-1409.
- Maruyama, S., y Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(5), 1393-1394.
- Masuda, O., Nakamura, Y., y Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *The Journal of nutrition*, 126(12), 3063.
- Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., y Perdigon, G. (2003). Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. *Handbook of fermented functional foods*, 177-201.
- Matoba, N., Usui, H., Fujita, H., y Yoshikawa, M. (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS letters*, 452(3), 181-184.

- Matthies, H., Stark, H., Hartrodt, B., Ruethrich, H.-L., Spieler, H.-T., Barth, A., y Neubert, K. (1984). Derivatives of β -casomorphins with high analgesic potency. *Peptides*, 5(3), 463-470.
- McClellan, S., Beggs, L. B., y Welch, R. W. (2014). Antimicrobial activity of antihypertensive food-derived peptides and selected alanine analogues. *Food Chemistry*, 146, 443-447.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*, 9(5), 305-313.
- McDonagh, D., y FitzGerald, R. J. (1998). Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *International Dairy Journal*, 8(1), 39-45.
- McPherson, A. V., Dash, M. C., y Kitchen, B. J. (1984). Isolation and composition of milk fat globule membrane material. *Journal of Dairy Research*, 51(02), 279-287.
- McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., y Healy, Á. (1994). Proteolysis of bovine α_{s2} -casein by chymosin. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 199(6), 429-432.
- Megías, M. D., Martínez-Teruel, A., y Hernández, M. R. (1999). Potential environmental impact of effluents from the artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproduct ensiling process using additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2455-2458.
- Megías, C., Yust, M. del M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F, y Vioque, J. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide after Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1928-1932.

- Meisel, H. (1997a). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science*, 50(1), 125-138.
- Meisel, H. (1997b). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Peptide Science*, 43(2), 119-128.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8(5), 363-373.
- Meisel, H., y FitzGerald, R. J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 27-31.
- Meisel, H., y FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1289-1296.
- Meisel, H., y Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science y Technology*, 1, 41-43.
- Mellander, O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 55(5-6), 247-255.
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., y Chamani, J. (2012a). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 278-286.
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., y Chamani, J. (2012b). Structure and ACE-inhibitory activity of peptides derived from hen egg white lysozyme. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(4), 353-360.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G., y Kim, S.-K. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., y Kim, S.-K. (2005b). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 581-587.
- Migliore-Samour, D., y Jollès, P. (1988). Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia*, 44(3), 188-193.
- Miguel, M., Alonso, M. J., Salaices, M., Aleixandre, A., y López-Fandiño, R. (2007a). Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. *Food Chemistry*, 104(1), 163-168.
- Miguel, M., y Aleixandre, A. (2006). Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1457-1460.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., y Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 112(1), 211-214.
- Miguel, M., López-Fandino, R., Ramos, M., y Aleixandre, A. (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 94(05), 731-737.
- Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R., Alonso, M. J., y Salaices, M. (2007b). Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 17(12), 1473-1477.
- Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., y Lopez-Fandino, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived

- from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1914-1920.
- Mine, Y. (1996). Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins. *Food Research International*, 29(2), 155-161.
- Mine, Y. (2007). Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(9), 875-884.
- Mine, Y., Ma, F., y Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1088-1094.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., y Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91(4), 965-980.
- Mirabella, N., Castellani, V., y Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., y Yamamoto, N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94(1), 84-91.
- 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. *American Journal of Hypertension*, 17(8), 701-706.

- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., y Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577-583.
- Mohanty, D. P., Tripathy, P., Mohapatra, S., y Samantaray, D. P. (2014). Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 3, 72-80.
- Molina, P. E., y Abumrad, N. N. (1994). Metabolic effects of opiates and opioid peptides. *Advances in neuroimmunology*, 4(2), 105-116.
- Monnai, M., Horimoto, Y., y Otani, H. (1998). Immunomodulatory effect of dietary bovine kappa-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft*, 53(3), 129-132.
- Montaño-Pérez, K. (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, 27(1), 21-29.
- Mora, L., Aristoy, M.-C., y Toldrá, F. (2016). Bioactive peptides in foods. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 395-400). Elsevier.
- Mora, L., Reig, M., y Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, Part C, 344-349.
- Moure, A., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41(2), 447-456.
- Mulder, H., y Walstra, P. (1974). *The milk fat globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods*. Wageningen (Países Bajos): PUDOC.

- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., y Vincieri, F. F. (2004). Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), 349-357.
- Mullally, M. M., Meisel, H., y FitzGerald, R. J. (1997a). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7(5), 299-303.
- Mullally, M. M., Meisel, H., y FitzGerald, R. J. (1997b). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2-3), 99-101.
- Müller, D. M., Carrasco, M. S., Simonetta, A. C., Beltramini, L. M., y Tonarelli, G. G. (2007). A synthetic analog of plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria: evidence for α -helical conformation involved in bacteria-membrane interaction. *Journal of Peptide Science*, 13(3), 171-178.
- Murakami, Y., y Hirata, A. (2000). Novel process for enzymatic hydrolysis of proteins in an aqueous two-phase system for the production of peptide mixture. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 30(1), 31-37.
- Murray, B. A., y FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773-791.
- Murray, B., Walsh, D. J., FitzGerald, R. J., y Meisel, H. (2005). ACE inhibitory peptides. En *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease* (pp. 269-315). CRC Press.
- Nagao, J., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., y Sonomoto, K. (2006). Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(3), 139-149.

- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., y Kuwata, T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1), 11-17.
- Najafian, L., y Babji, A. S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1), 178-185.
- Nakagawa, K., Jarungrumlert, T., y Adachi, S. (2016). Structural changes in casein aggregates under frozen conditions affect the entrapment of hydrophobic materials and the digestibility of aggregates. *Chemical Engineering Science*, 143, 287-296.
- 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 letters*, 438(3), 255-257.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., y Takano, T. (1995a). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 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 to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78(6), 1253-1257.
- Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Mio, H., Ishikawa, S., y Itoh, M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science*, 67(1), 434-437.

- Nanjo, F., Mori, M., Goto, K., y Hara, Y. (1999). Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(9), 1621-1623.
- Narai-Kanayama, A., Shikata, Y., Hosono, M., y Aso, K. (2010). High level production of bioactive di- and tri-tyrosine peptides by protease-catalyzed reactions. *Journal of Biotechnology*, 150(3), 343-347.
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., y Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551-554.
- Naz, S. (2002). Proteolytic Enzymes. En S. Naz (Ed.), *Enzymes and food* (pp. 125-135). Oxford: Oxford University Press.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G., y Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27(9), 2082-2089.
- Neeser, J. R., Chambaz, A., Vedovo, S. D., Prigent, M. J., y Guggenheim, B. (1988). Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives. *Infection and Immunity*, 56(12), 3201-3208.
- Negro, D., Montesano, V., Grieco, S., Crupi, P., Sarli, G., De Lisi, A., y Sonnante, G. (2012). Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *Journal of food science*, 77(2), C244-C252.
- Ngoh, Y.-Y., y Gan, C.-Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331-337.

- Nguyen, L. T., Haney, E. F., y Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Ni, H., Li, L., Liu, G., y Hu, S.-Q. (2012). Inhibition mechanism and model of an angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory hexapeptide from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *PLoS ONE*, 7(5), e37077.
- Nimalaratne, C., Bandara, N., y Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467-472.
- Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., y Wu, J. (2011). Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129(1), 155-161.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *The Journal of nutrition*, 129(7), 1402S-1406s.
- Noh, D. O., y Suh, H. J. (2015). Preparation of egg white liquid hydrolysate (ELH) and its radical-scavenging activity. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(3), 183-189.
- Nurminen, M.-L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H., y Vapaatalo, H. (2000). α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66(16), 1535-1543.
- Nyberg, F., Sanderson, K., y Glämsta, E.-L. (1997). The hemorphins: A new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Peptide Science*, 43(2), 147-156.

- Offengenden, M., Fentabil, M. A., y Wu, J. (2011). N-glycosylation of ovomucin from hen egg white. *Glycoconjugate Journal*, 28(3-4), 113-123.
- Okada, Y., y Okada, M. (1998). Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 401-406.
- Omana, D. A., Wang, J., y Wu, J. (2010). Ovomucin - a glycoprotein with promising potential. *Trends in Food Science y Technology*, 21(9), 455-463.
- Ondetti, M. A., Rubin, B., y Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196(4288), 441-444.
- Ondetti, M. A., y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51(1), 283-308.
- Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., y Takahashi, K. (2006). Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *International Journal of Food Science y Technology*, 41(4), 383-386.
- Ono, T., Takagi, Y., y Kunishi, I. (1998). Casein phosphopeptides from casein micelles by successive digestion with pepsin and trypsin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 16-21.
- Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., y Otte, J. (2016). Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 480-486.
- Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M., y Nielsen, M. S. (2007a). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472.

- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., y El-Shabrawy, S. A. (2007b). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(5), 488-503.
- Pan, D., y Guo, Y. (2010). Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *International dairy journal*, 20(7), 472-479.
- Pan, Y., Rowney, M., Guo, P., y Hobman, P. (2007). Biological properties of lactoferrin: an overview. *Australian Journal of Dairy Technology*, 62(1), 31.
- Panchaud, A., Affolter, M., y Kussmann, M. (2012). Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of proteomics*, 75(12), 3546-3559.
- Papoff, C. M., Mauriello, R., Pirisi, A., Piredda, G., Addis, M., y Chianese, L. (2004). Proteolytic activity of animal rennet on ovine casein. *Milchwissenschaft*, 59(7-8), 414-416.
- Park, Y. W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14(2), 151-159.
- Park, Y. W. (2006). Goat milk. Chemistry and nutrition. En Y. W. Park y G. F. W. Haenlein (Eds.), *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. (pp. 34-58). Oxford: Blackwell Publishing.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., y Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113.
- Park, K.-J., y Hyun, C.-K. (2002). Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 633-638.

- Park, P.-J., Jung, W.-K., Nam, K.-S., Shahidi, F., y Kim, S.-K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.
- Park, C. B., Yi, K.-S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., y Kim, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8245-8250.
- Parkin, K. L. (2010). Enzimas. En *Fennema Química de los alimentos* (3ª Edición, pp. 374-375). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., Irvine, D., y Mullen, K. (1988). Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. *Journal of Dairy Science*, 71(6), 1472-1483.
- Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, D., ... Stone, C. A. (1980). A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, 288(5788), 280-283.
- Patsioura, A., Galanakis, C. M., y Gekas, V. (2011). Ultrafiltration optimization for the recovery of β -glucan from oat mill waste. *Journal of membrane science*, 373(1), 53-63.
- Payens, T. A. J., Wiersma, A. K., y Brinkhuis, J. (1977). On enzymatic clotting processes I. kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions. *Biophysical Chemistry*, 6(3), 253-261.
- Pellegrini, A., Hülsmeier, A. J., Hunziker, P., y Thomas, U. (2004). Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1672(2), 76-85.

- Perea, A., y Ugalde, U. (1996). Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(1), 29-34.
- Perpetuo, E. A., Juliano, L., y Lebrun, I. (2003). Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides obtained from tryptic hydrolysis of casein. *Journal of Protein Chemistry*, 22(7-8), 601-606.
- Petrat-Melin, B., Kristiansen, G. H., Le, T. T., Poulsen, N. A., Larsen, L. B., y Young, J. F. (2016). In vitro gastrointestinal digestion of purified bovine kappa-casein variants A, B, and E: Effects on antioxidant and angiotensin 1-converting enzyme inhibitory capacity. *International Dairy Journal*, 57, 44-51.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., y O'Brien, N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), 643-654.
- Picariello, G., Ferranti, P., Mamone, G., Roepstorff, P., y Addeo, F. (2008). Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*, 8(18), 3833-3847.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- Pihlanto, A. (2016). Milk Proteins: Bioactive Peptides. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- Pihlanto-Leppälä, A., Antila, P., Mäntsälä, P., y Hellman, J. (1994). Opioid peptides produced by in-vitro proteolysis of bovine caseins. *International Dairy Journal*, 4(4), 291-301.

- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Paakkari, I., Tupasela, T., y Korhonen, H. J. T. (1996). Opioid whey protein peptides obtained by membrane filtration. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 311, 36-38.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., y Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., y Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325-331.
- Pimentel, C., Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., y Rodrigues-Pousada, C. (2007). Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *The FEBS journal*, 274(10), 2523-2539.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L. H., y Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42, 324-330.
- Pisanu, S., Pagnozzi, D., Pes, M., Pirisi, A., Roggio, T., Uzzau, S., y Addis, M. F. (2015). Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential. *International Dairy Journal*, 42, 26-33.
- Pokora, M., Zambrowicz, A., Dąbrowska, A., Eckert, E., Setner, B., Szoltyśnik, M., Szewczuk, Z., Polanowski, A., Trziszka, T., y Chrzanowska, J. (2014). An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. *Food Chemistry*, 151, 500-505.
- Pouliot Y, Gauthier S, y Groleau P. (2006). Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. En *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease* (pp. 639-655). CRC Press.

- Pouzo, L. B., Descalzo, A. M., Zaritzky, N. E., Rossetti, L., y Pavan, E. (2016). Antioxidant status, lipid and color stability of aged beef from grazing steers supplemented with corn grain and increasing levels of flaxseed. *Meat Science*, 111, 1-8.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., y Aluko, R. E. (2010) Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712-4718.
- Pripp, A. H. (2008). Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food y Nutrition Research*, 52(1), 1641.
- Qian, Z.-J., Je, J.-Y., y Kim, S.-K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8398-8403.
- Qian, Z.-Y., Jollès, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F., y Fiat, A.-M. (1995). Sheep κ -casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1244(2), 411-417.
- Quirós, A., Chichón, R., Recio, I., y López-Fandiño, R. (2007a). The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry*, 104(4), 1734-1739.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Alexandre, A., y Recio, I. (2007b). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.

- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y., y Kim, S.-K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175-182.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., Pires, E., y Faro, C. (1998). Identification and proteolytic processing of procardosin A. *European journal of biochemistry*, 255(1), 133-138.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., y Pires, E. (1996). Action on bovine α s1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297(1), 83-89.
- Rampilli, R., Barzaghi, S., Molinari, P., y Tenaglia, L. (1992). HPLC analysis of rennet enzymes and fermentation-produced chymosin. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 43, 387-401.
- Rampilli, M., Larsen, R., y Harboe, M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International dairy journal*, 15(11), 1130-1137.
- Rawendra, R. D. S., Aisha, Chang, C.-I., Aulanni'am, Chen, H.-H., Huang, T.-C., y Hsu, J.-L. (2013). A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins. *Journal of Proteomics*, 94, 359-369.
- Recio, I., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Ruiz, J. A., Miguel, M., y Amigo, L. (2006). *Bioactive peptides in enzymatic hydrolysates milk caseins and method of obtaining same*. International WO Patent, 131586.
- Recio, I., y Visser, S. (1999). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin: In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831(2), 191-201.

- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., y Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536-547.
- Regeher, G. O., Smithers, G. W., Mitchell, I. R., McIntosh, G. H., y Dionysius, D. A. (1997). Bioactive factors in milk: natural and induced. En *Milk composition, production and biotechnology* (1st ed., pp. 119-132). Nueva York; Wallingford: CAB International.
- Reis, P. J., y Malcata, F. X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101(1), 122-133.
- Rémond, D., Savary-Auzeloux, I., y Boutrou, R. (2016). Bioactive peptides derived from food proteins. En *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins* (pp. 3-11). Elsevier.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., y Xue, S. J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108(2), 727-736.
- Ren, Y., Wu, H., Li, X., Lai, F., y Xiao, X. (2014a). Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(4), 888-894.
- Ren, Y., Wu, H., Li, X., Lai, F., Zhao, G., y Xiao, X. (2014b). A Two-Step, One-Pot Enzymatic Method for Preparation of Duck Egg White Protein Hydrolysates with High Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1227-1240.
- Richman, P. G., y Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 250(4), 1422-1426.

- Ripolles, D., Harouna, S., Parrón, J. A., Calvo, M., Pérez, M. D., Carramiñana, J. J., y Sánchez, L. (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *International Dairy Journal*, 45, 15-22.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., y Wichers, H. J. (2001a). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295-302.
- Rival, S. G., Fornaroli, S., Boeriu, C. G., y Wichers, H. J. (2001b). Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 287-294.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., y Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1), 62-71.
- Rodríguez-Díaz, J. C., Kurozawa, L. E., Netto, F. M., y Hubinger, M. D. (2011). Optimization of the enzymatic hydrolysis of blue shark skin. *Journal of Food Science*, 76(7), 938-949.
- Rose, D. J., DeMeo, M. T., Keshavarzian, A., y Hamaker, B. R. (2007). Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: importance of fermentation pattern. *Nutrition Reviews*, 65(2), 51-62.
- Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., y Vorobiev, E. (2015). High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 885-894.
- Rossini, K., Noreña, C. P. Z., Cladera-Olivera, F., y Brandelli, A. (2009). Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates

- and mechanically deboned poultry meat. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 862-867.
- Roufik, S., Gauthier, S. F., y Turgeon, S. L. (2006). In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 16(4), 294-302.
- Roy, M. K., Watanabe, Y., y Tamai, Y. (1999). Induction of apoptosis in HL-60 cells by skimmed milk digested with a proteolytic enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(4), 426-432.
- Ruiz-Giménez, P., Ibáñez, A., Salom, J. B., Marcos, J. F., López-Díez, J. J., Vallés, S., Torregrosa, G., Alborch, E., y Manzanares, P. (2010). Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 6721-6727.
- Rutherford-Markwick, K. J., y Moughan, P. J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955-966.
- Ruttarattanamongkol, K. (2012). Functionalization of whey proteins by reactive supercritical fluid extrusion. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(4), 395-402.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., y Stanton, C. (2011). Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients*, 3(9), 765-791.
- Rydlo, T., Miltz, J., y Mor, A. (2006). Eukaryotic Antimicrobial Peptides: Promises and Premises in Food Safety. *Journal of Food Science*, 71(9), R125-R135.
- Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., y Ferranti, P. (2013). An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, 54(1), 925-934.

- Saengkanuk, A., Nuchadomrong, S., Jogloy, S., Patanothai, A., y Srijaranai, S. (2011). A simplified spectrophotometric method for the determination of inulin in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *European Food Research and Technology*, 233(4), 609-616.
- Sagardia, I., Roa-Ureta, R. H., y Bald, C. (2013). A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides. *Food chemistry*, 136(3), 1370-1376.
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.-P., y Ben Amar, R. (2014). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food Research International*, 65, Part C, 329-336.
- Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R., y Nishimura, T. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1741-1745.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. En Z. Bösze (Ed.), *Bioactive Components of Milk* (pp. 295-317). Springer New York.
- 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. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-1440.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., y Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86(1), 99-103.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., y Juneja, L. R. (2005). Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation

- in beef homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 464-468.
- Salaün, F., Mietton, B., y Gaucheron, F. (2005). Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, 15(2), 95-109.
- Samaranayaka, A. G. P., y Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254.
- Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M., Pais, M. S., y Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(4), 305-312.
- Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., y Jaiganesh, R. (2011). Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, 32(7), 1496-1501.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Bastida, J., Viladomat, F., y Codina, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1008(1), 57-72.
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., y Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170-181.
- Sanz Ceballos, L. (2007). *Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico*. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, Granada.
- Sanz Ceballos, L., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., y Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk

- produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 322-329.
- Sarmadi, B. H., e Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debysier, G., Van Beeumen, J., Domingues, P., Amado, F., Pires, E., Domingues, M. R. M., y Ramos, M. T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2), 429-439.
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., y Nakano, T. (2002). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6245-6252.
- Sato, R., Noguchi, T., y Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) Enhances calcium absorption form the ligated segment of rat small intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32(1), 67-76.
- Sendra, E., Mor-Mur, M., Pla, R., Guamis, B. (1999). Evaluation of freezing pressed curd for delayed ripening of semi-hard ovine cheese. *Milchwissenschaft*, 54, 550-553.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., y Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 326-330.
- Sergio, L., De Paola, A., Linsalata, V., Cardinali, A., Vanadia, S., y Di Venere, D. (2010). The use of artichoke peroxidase to remove phenols from olive mill waste water. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 3028-3036.

- Shahidi, F., y Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1-2), 55-70.
- Shai, Y., y Oren, Z. (2001). From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629-1641.
- Shanmugam, V. P., Kapila, S., Sonfack, T. K., y Kapila, R. (2015). Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. *International Dairy Journal*, 42, 1-5.
- Sharma, S., Singh, R., y Rana, S. (2011). Bioactive peptides: a review. *International Journal Bioautomation*, 15(4), 223-250.
- Sheih, I.-C., Fang, T. J., y Wu, T.-K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 115(1), 279-284.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., Masuda, J., Yamauchi, A., Ohwada, S., Nakano, T., Yamaguchi, T., Saito, T., Muramoto, K., y Sato, M. (2010). Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fisheries Science*, 76(5), 865-872.
- Shu, M., Yu, R., Zhang, Y., Wang, J., Yang, L., Wang, L., y Lin, Z. (2013). Predicting the activity of antimicrobial peptides with amino acid topological information. *Medicinal Chemistry*, 9(1), 32-44.

- Si, D., Wang, Y., Zhou, Y.-H., Guo, Y., Wang, J., Zhou, H., Li, Z.-S., y Fawcett, J. P. (2009). Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(3), 629-634.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., y Rodríguez-López, J. N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66(1), 41-49.
- Silva, S. V., Barros, R. M., y Malcata, F. X. (2002). Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, 67(5), 1746-1751.
- Silva, S. V., y Malcata, F. X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food chemistry*, 89(1), 19-26.
- Silva, S. V., Pihlanto, A., y Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3336-3344.
- Singh, B. P., Vij, S., y Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Sinnott, M. (1998). *Comprehensive biological catalysis. A mechanistic reference* (Vol. I). San Diego, CA: Academic Press.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., y Nurminen, M.-L. (2002). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69(1), 103-111.
- Smith, D. A., y Stratton, J. E. (2007). Food preservation, safety, and shelf life extension. *University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture Natural Resources, Lincoln, NE*.

- Sousa, M. J., y Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of Ovine and Caprine Caseins in Solution by Enzymatic Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 305-314.
- Stiuso, P., Caraglia, M., Rosa, G. D., y Giordano, A. (2013). Bioactive Peptides in Cancer: Therapeutic Use and Delivery Strategies. *Journal of Amino Acids*, 2013.
- Sturner, R. A., y Chang, K. J. (1988). Opioid peptide content in infant formulas. *Pediatric Research*, 23, 4-10.
- Su, X., Dong, C., Zhang, J., Su, L., Wang, X., Cui, H., y Chen, Z. (2014). Combination therapy of anti-cancer bioactive peptide with Cisplatin decreases chemotherapy dosing and toxicity to improve the quality of life in xenograft nude mice bearing human gastric cancer. *Cell y Bioscience*, 4, 7.
- Su, G., Ren, J., Yang, B., Cui, C., y Zhao, M. (2011). Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases. *Food Chemistry*, 126(3), 1306-1311.
- Su, L., Xu, G., Shen, J., Tuo, Y., Zhang, X., Jia, S., Chen, Z., y Su, X. (2010). Anticancer bioactive peptide suppresses human gastric cancer growth through modulation of apoptosis and the cell cycle. *Oncology reports*, 23(1), 3.
- Sudhakar, S., y Nazeer, R. A. (2015). Preparation of potent antioxidant peptide from edible part of shortclub cuttlefish against radical mediated lipid and DNA damage. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 593-601.
- Suetsuna, K., y Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(9), 450-454.

- Suetsuna, K., Ukeda, H., y Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(3), 128-131.
- Sun, S., Niu, H., Yang, T., Lin, Q., Luo, F., y Ma, M. (2014). Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides prepared by pepsin digestion: Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3195-3200.
- Surai, P. F., y Sparks, N. H. C. (2001). Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science y Technology*, 12(1), 7-16.
- Tagliazucchi, D., Helal, A., Verzelloni, E., Bellesia, A., y Conte, A. (2016a). Composition and properties of peptides that survive standardised in vitro gastro-pancreatic digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 61, 196-204.
- Tagliazucchi, D., Shamsia, S., y Conte, A. (2016b). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides during in vitro gastro-intestinal digestion of camel milk. *International Dairy Journal*, 56, 119-128.
- Tagliazucchi, D., Shamsia, S., Helal, A., y Conte, A. (2017). Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by in vitro gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 6-16.
- Tang, W., Zhang, H., Wang, L., y Qian, H. (2013). Antimicrobial peptide isolated from ovalbumin hydrolysate by immobilized liposome-binding extraction. *European Food Research and Technology*, 237(4), 591-600.
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., Saberi, M. R., y Chamani, J. (2013). Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 18, 212-219.

- Tauzin, J., Miclo, L., y Gaillard, J.-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Letters*, 531(2), 369-374.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J. M., Martínez-Cacha, A., y Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18(2), 139-146.
- Tejada, L., y Fernández-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 125-131.
- Teschemacher, H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1331-1344.
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharram, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T., y Araki, T. (2010). Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 151(1), 84-91.
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., y Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706-714.
- Tian, M., Fang, B., Jiang, L., Guo, H., Cui, J., y Ren, F. (2015). Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from β -Lactoglobulin using QSAR modeling. *Dairy Science y Technology*, 95(4), 451-463.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., y Petró, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359-365.

- Tokunaga, T., Tamura, Y., y Koizumi, T. (2010). Antioxidant activity of fish sauces including puffer (*Lagocephalus wheeleri*) fish sauce measured by the oxygen radical absorbance capacity method. *Molecular Medicine Reports*, 3(4), 663-668
- Tomé, D., y Debabbi, H. (1998). Physiological Effects of Milk Protein Components. *International Dairy Journal*, 8(5), 383-392.
- Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W., y Shimamura, S. (1994). A review: The active peptide of lactoferrin. *Pediatrics International*, 36(5), 585-591.
- Toropova, A. P., Toropov, A. A., Rasulev, B. F., Benfenati, E., Gini, G., Leszczynska, D., y Leszczynski, J. (2012). QSAR models for ACE-inhibitor activity of tri-peptides based on representation of the molecular structure by graph of atomic orbitals and SMILES. *Structural Chemistry*, 23(6), 1873-1878.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. del M., Recio, I., Alaiz, M., y Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202.
- Trujillo, A. J., Buffa, M., Casals, I., Fernández, P., y Guamis, B. (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 3(4), 309-319.
- Tsai, J.-S., Chen, J.-L., y Pan, B. S. (2008). ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry*, 43(7), 743-747.
- Tsou, M.-J., Kao, F.-J., Tseng, C.-K., y Chiang, W.-D. (2010). Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 122(1), 243-248.

- Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M., y Sugisawa, K. (1991). Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kuishi*, 65, 1635-1641.
- Tunick, M. H., Ren, D. X., Van Hekken, D. L., Bonnaillie, L., Paul, M., Kwoczak, R., y Tomasula, P. M. (2016). Effect of heat and homogenization on in vitro digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4124-4139.
- Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyryrynen, 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. *Journal of Human Hypertension*, 18(11), 795-802.
- Turgeon, S. L., y Gauthier, S. F. (1990). Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization. *Journal of Food Science*, 55(1), 106-110.
- Udenigwe, C. C., y Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24.
- Van Boekel, M. A. J. S., y Folkerts, T. (1991). Effect of heat treatment on the stability of milk fat globules. *Milchwissenschaft*, 46, 758-765.
- van der Kraan, M. I. A., Nazmi, K., Teeken, A., Groenink, J., van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Bolcscher, J. C. M., y Nieuw, A. V. (2005). Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. *Biological Chemistry*, 386(2), 137-142.
- Vanderghem, C., Francis, F., Danthine, S., Deroanne, C., Paquot, M., De Pauw, E., y Blecker, C. (2011). Study on the susceptibility of the bovine milk fat

- globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins. *International Dairy Journal*, 21(5), 312-318.
- Van Hooydonk, A. C. M., y Walstra, P. (1987). Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands milk and Dairy Journal*, 41(1), 19-47.
- Verdini, R. A., Zorrilla, S. E., y Rubiolo, A. C. (2005). Effects of the freezing process on proteolysis during the ripening of Port Salut Argentino cheeses. *International Dairy Journal*, 15(4), 363-370.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., y Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 17(6), 621-626.
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., y Pires, E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, 235(3), 762-768.
- Vermeirssen, V., Camp, J. V., y Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(03), 357.
- Vieira de Sá, F., y Barbosa, M. (1972). Cheese-making with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal of Dairy Research*, 39, 335-343.
- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., y Faro, C. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, 45(5), 529-539.
- Visser, S., y Slangen, K. J. (1977). Specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine beta-casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31(1), 16-30.

- Wakabayashi, H., Takase, M., y Tomita, M. (2003). Lactoferricin Derived From Milk Protein Lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1277-1287.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., y van Boekel, M. A. J. S. (2001). Refrigeración y congelación. En *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos* (pp. 324-325). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Walther, B., y Sieber, R. (2011). Bioactive proteins and peptides in foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81(23), 181-192.
- Wang, B., Gong, Y.-D., Li, Z.-R., Yu, D., Chi, C.-F., y Ma, J.-Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 6, 176-185.
- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y., y Lin, B. (2008). Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 111(2), 302-308.
- Wang, B., Li, L., Chi, C.-F., Ma, J.-H., Luo, H.-Y., y Xu, Y. (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1713-1719.
- Wang, L.L., y Xiong, Y. I. (2008). Inhibition of Oxidant-Induced Biochemical Changes of Pork Myofibrillar Protein by Hydrolyzed Potato Protein. *Journal of Food Science*, 73(6), C482-C487.
- Watanabe, K., Tsuge, Y., Shimoyamada, M., Ogama, N., y Ebina, T. (1998). Antitumor effects of pronase-treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3033-3038.

- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., y Clauser, E. (1991). The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *Journal of Biological Chemistry*, 266(14), 9002-9008.
- Welderufael, F. T., Gibson, T., y Jauregi, P. (2012). Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from β -lactoglobulin- and casein-derived peptides: An integrative approach. *Biotechnology Progress*, 28(3), 746-755.
- Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., y Wong, D. W. S. (2003). *Handbook of food enzymology*. Nueva York: Marcel Dekker.
- White, P. C., Cordeiro, M. C., Arnold, D., Brodelius, P. E., y Kay, J. (1999). Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16685-16693.
- Wiśliński, M., y Popielarz, M. (1994). Occurrence of prochymosin variants in the abomasum of bovine fetuses and calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 41(1-10), 171-179.
- Wong, P. Y. Y., y Kitts, D. D. (2003). Chemistry of Buttermilk Solid Antioxidant Activity. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1541-1547.
- Wu, J., 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732-738.
- Wu, J., y Aluko, R. E. (2007). Quantitative structure-activity relationship study of bitter di- and tri-peptides including relationship with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Peptide Science*, 13(1), 63-69.

- Wu, J., y Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35(4), 367-375.
- Wu, C.-R., Huang, M.-Y., Lin, Y.-T., Ju, H.-Y., y Ching, H. (2007). Antioxidant properties of *Cortex fraxini* and its simple coumarins. *Food Chemistry*, 104(4), 1464-1471.
- Wu, Z., Pan, D., Zhen, X., y Cao, J. (2013a). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF-MS/MS: ACE-inhibitory peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1331-1337.
- Wu, S., Qi, W., Li, T., Lu, D., Su, R., y He, Z. (2013b). Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry*, 141(3), 2944-2951.
- Xu, R.-J. (1998). Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International*, 14(1), 1-16.
- Xu, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., y Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, 73(1), C11-C18.
- Xu, X., Katayama, S., y Mine, Y. (2007). Antioxidant activity of tryptic digests of hen egg yolk phosvitin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2604-2608.
- Yamamoto, N., Akino, A., y Takano, T. (1994). antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77(4), 917-922.
- Yamamoto, N., Ejiri, M., y Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1345-1355.

- Yamamoto, N., Ejiri, M., y Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1345-1355.
- Ye, A., Cui, J., Dalgleish, D., y Singh, H. (2017). Effect of homogenization and heat treatment on the behavior of protein and fat globules during gastric digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 36-47.
- Yeaman, M. R., y Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27-55.
- Yi, H. J., Kim, J. Y., Kim, K. H., Lee, H. J., y Lee, H. J. (2003). Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. *Food Science and Biotechnology*, 12(3), 224-227.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., y Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213-222.
- Yoshikawa, M. (2015). Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*, 72, 208-225.
- Yoshikawa, M., Sasaki, R., y Chiba, H. (1981). Effects of chemical phosphorylation of bovine casein components on the properties related to casein micelle formation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 909-914.
- You, S.-J., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E., y Wu, J. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43(3), 848-855.
- You, S.-J., y Wu, J. (2011). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of egg protein hydrolysates produced with

- gastrointestinal and nongastrointestinal enzymes. *Journal of Food Science*, 76(6), C801-C807.
- Young, D., Nau, F., Pasco, M., y Mine, Y. (2011a). Identification of hen egg yolk-derived phosvitin phosphopeptides and their effects on gene expression profiling against oxidative stress-induced Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9207-9218.
- Yu, Y., Hu, J., Miyaguchi, Y., Bai, X., Du, Y., y Lin, B. (2006). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*, 27(11), 2950-2956.
- Yu, P.-L., Linden, D. S. van der, Sugiarto, H., y Anderson, R. C. (2010). Antimicrobial peptides isolated from the blood of farm animals. *Animal Production Science*, 50(7), 660-669.
- Yu, L., Yang, L., An, W., y Su, X. (2014a). Anticancer bioactive peptide-3 inhibits human gastric cancer growth by suppressing gastric cancer stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(4), 697-711.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., y Liu, J. (2014b). Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs: opportunities and challenges: Application of proteins and peptides from hen eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), 2839-2845.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., y Chen, F. (2011b). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, 129(4), 1376-1382.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.067>
- Yu, Z., Zhao, W., Liu, J., Lu, J., y Chen, F. (2011c). QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from egg white protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 921-926.

- Yüksel, Z., y Erdem, Y. K. (2005). The influence of main milk components on the hydrophobic interactions of milk protein system in the course of heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 67(3), 301-308.
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Chrzanowska, J., Szoltyfik, M., Dabrowska, A., y Trziszka, T. (2013a). Antioxidative peptides derived from denaturated egg white protein. *Italian journal of food science*, 25, 169-180.
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Eckert, E., y Trziszka, T. (2013b). Evaluation of the ACE-Inhibitory Activity of Egg-White Proteins Degraded with Pepsin. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(2).
- Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., Bakar, F. A., Philip, R., y Saari, N. (2014). Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. *Food Research International*, 62, 726-734.
- Zhang, X., y Beynen, A. C. (1993). Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *British Journal of Nutrition*, 70(01), 139-146.
- Zhang, Y., Duan, X., y Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21.
- Zhang, L., Li, J., y Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, 101(7), 2084-2089.
- Zhao, Q. Y., Piot, J. M., Gautier, V., y Cottenceau, G. (1996). Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6), 778-784.

- Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F., y Piot, J. M. (1997). Opioid peptides derived from hemoglobin: Hemorphins. *Peptide Science*, 43(2), 75-98.
- Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J., y Zeng, M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 1028-1033.
- Zhou, K., Canning, C., y Sun, S. (2013). Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 331-335.
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X., y Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of Alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721.
- Zhu, C., y Liu, X. (2013). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1197-1202.
- Zioudrou, C., Streaty, R. A., y Klee, W. A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(7), 2446-2449.
- Zou, T.-B., He, T.-P., Li, H.-B., Tang, H.-W., y Xia, E.-Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.
- Zucht, H.-D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.-J., y Forssmann, W.-G. (1995). Casocidin-I: a casein- α 2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372(2-3), 185-188.

