

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE
LECHE DE CABRA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE
LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO JAVIER ESPEJO CARPIO

2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Javier Espejo Carpio
D.L.: GR 858-2013
ISBN: 978-84-9028-455-1



Universidad de Granada



Los Directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza el trabajo ha sido realizado por el/la doctorando/a bajo nuestra dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el referido Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZAMOS la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero,

GRANADA, 08/10/2012

Director/es de la Tesis

Fdo.: Emilia María Guadix Escobar

Fdo.: Antonio María Guadix Escobar

Fdo.: María del Carmen Almécija Rodríguez

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, gracias a una beca asociada al Proyecto de Excelencia “TEP-02579, OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS Y OLIGOSACÁRIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LECHE DE CABRA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS” financiado por la Junta de Andalucía.

Hay muchas personas que han contribuido de una u otra manera a hacer posible que este trabajo salga adelante. Magníficos profesionales y mejores personas a los que me gustaría mostrar mi reconocimiento.

En primer lugar, agradecer a los doctores Emilia María Guadix, Antonio María Guadix y María del Carmen Almécija la posibilidad que me han dado de iniciarme en la investigación así como el apoyo y orientación brindados durante todo este tiempo.

Agradecer a la doctora Jeanette Otte, del Departamento de Food Science de la Universidad de Copenhague, por permitirme trabajar con ella durante tres inolvidables meses en los que aprendí y disfruté a partes iguales. Especialmente agradecido por su inestimable ayuda en la identificación de péptidos.

Quisiera agradecer a todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química. Muy especialmente a mis compañeros de laboratorio: Raúl, Pedro, Rocío y María del Mar, por haber estado ahí siempre que los he necesitado y sobre todo por todos esos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, así da gusto trabajar. Igualmente agradecer a todas las personas que me ayudaron durante mi estancia en Copenhague, en especial a Cristian de Gobba y Glyka Goldfish, muchas gracias por todo.

No puedo olvidarme de todos mis amigos porque, aunque creo que todavía no saben exactamente “qué hago con las cabras”, son una parte importante de esta tesis.

Por último, quiero agradecer a toda mi familia su apoyo y ánimo constante y, muy especialmente, a los responsables de que este trabajo haya llegado a buen puerto, sin ellos nada de esto hubiera sido posible: Julia, Ezequiel, Rocío y Almudena.

Tabla de contenido

1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	17
2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas	19
2.1.1. Química del enlace peptídico	19
2.1.2. Propiedades de los hidrolizados.....	21
2.1.3. Aplicaciones de los hidrolizados.....	23
2.2. Hipertensión.....	24
2.2.1. La enzima convertidora de la angiotensina.....	25
2.2.2. La inhibición de ACE	27
2.2.3. Métodos para la determinación de la actividad inhibidora de ACE.....	29
2.3. Péptidos inhibidores de ACE derivados de proteínas de alimentos	34
2.3.1. Péptidos derivados de leche	35
2.3.2. Fraccionamiento e identificación	38
2.3.3. Relación estructura-actividad	39
2.3.4. Biodisponibilidad	42
2.4. Tratamiento de hidrolizados	47
2.4.1. Purificación	48
2.4.2. Estabilización: secado por atomización	50
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.1. Materiales	61
4.1.1. Sustrato	61
4.1.2. Enzimas.....	61
4.2. Operaciones de filtración	62
4.2.1. Membranas cerámicas	62
4.2.2. Dispositivo experimental.....	66
4.2.3. Modelado del flujo de filtrado	67

4.2.4.	Limpieza.....	70
4.3.	Hidrólisis.....	72
4.3.1.	Determinación del grado de hidrólisis	74
4.4.	Medida de la actividad inhibidora <i>in vitro</i>	75
4.4.1.	Método espectrofotométrico	76
4.4.2.	Método fluorométrico.	78
4.5.	Medida de la concentración de proteína.....	79
4.5.1.	Método Lowry	79
4.5.2.	Método ácido bicinconínico	80
4.6.	Fraccionamiento de hidrolizados	81
4.7.	Identificación de péptidos.....	82
4.8.	Digestión <i>in vitro</i>	83
4.9.	Secado por atomización	84
4.10.	Procedimientos de cálculo y estadísticos.....	86
4.10.1.	Superficies de Respuesta.....	86
4.10.2.	Optimización biobjetivo	88
4.10.3.	Comparación de muestras	89
5.	OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LECHE DE CABRA	91
5.1.1.	Planteamiento	93
5.2.	Procedimiento experimental	93
5.3.	Resultados y discusión	94
5.3.1.	Grado de hidrólisis	95
5.3.2.	Actividad inhibidora de ACE	103
5.3.3.	Optimización biobjetivo	107
5.4.	Conclusiones.....	110
6.	FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LECHE DE CABRA CON MEMBRANAS	111
6.1.	Planteamiento.....	113
6.2.	Procedimiento experimental	113

6.3.	Resultados y discusión	114
6.4.	Conclusiones.....	116
7.	INFLUENCIA DEL SUSTRATO Y DE LA ENZIMA EN LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE ACE..	117
7.1.	Planteamiento	119
7.2.	Procedimiento experimental	119
7.3.	Resultados y discusión	120
7.3.1.	Grado de hidrólisis	120
7.3.2.	Actividad inhibidora de ACE	122
7.4.	Conclusiones.....	128
8.	CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ACE.....	129
8.1.	Planteamiento	131
8.2.	Procedimiento experimental	131
8.3.	Resultados y discusión	132
8.3.1.	Caracterización de hidrolizados	132
8.3.2.	Fraccionamiento de hidrolizados	134
8.3.3.	Identificación de péptidos.....	139
8.4.	Conclusiones.....	147
9.	DIGESTIÓN SIMULADA DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ACE	149
9.1.	Planteamiento	151
9.2.	Procedimiento experimental	151
9.3.	Resultados y discusión	151
9.4.	Conclusiones.....	155
10.	PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ACE CON MEMBRANAS.....	157
10.1.	Planteamiento	159
10.2.	Procedimiento experimental.....	159
10.3.	Resultados y discusión	160
10.3.1.	Evolución del flujo de permeado	161
10.3.2.	Estudio de la etapa de limpieza.....	168

10.3.3.	Actividad inhibidora de ACE de las fracciones	170
10.4.	Conclusiones.....	172
11.	SECADO POR ATOMIZACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ACE.....	173
11.1.	Planteamiento	175
11.2.	Procedimiento experimental.....	175
11.3.	Resultados y discusión	176
11.3.1.	Temperatura de salida del aire	177
11.3.2.	Rendimiento	180
11.3.3.	Humedad del hidrolizado seco.....	186
11.3.4.	Actividad inhibidora	189
11.4.	Conclusiones.....	195
12.	CONCLUSIONES.....	197
13.	BIBLIOGRAFÍA	201
14.	SUMMARY OF THE THESIS.....	223

1. Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2005 provocaron alrededor del 30% de las muertes y se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas. En la actualidad, el principal factor de riesgo de estas enfermedades es la hipertensión, que afecta a más del 25% de la población mundial. Por tanto, el control y tratamiento de la hipertensión es de vital importancia. Una de las vías investigadas para paliar el problema, consiste en la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). Esta enzima actúa sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona provocando la transformación de angiotensina I en angiotensina II (un potente vasoconstrictor) y sobre el sistema calicreína-kinina degradando el vasodilatador bradiquinina, todo ello provoca un aumento de la presión sanguínea. Hoy en día existen péptidos sintéticos (principios activos de medicamentos) capaces de inhibir a ACE reduciendo así la presión sanguínea. Sin embargo, estos medicamentos presentan algunos efectos secundarios indeseables. Dada la magnitud del problema y su importancia para la salud pública, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a la obtención de inhibidores naturales de ACE procedentes de la hidrólisis de proteínas alimentarias, con el objetivo de introducirlos en la formulación de alimentos funcionales. Estos péptidos no podrían sustituir al medicamento pero sí ayudar en su tratamiento y prevención.

Así, el objetivo de este trabajo de investigación es la producción de péptidos inhibidores de ACE a partir de las proteínas de leche de cabra.

Para ello se ha estudiado la hidrólisis enzimática con proteasas de origen animal y bacteriano (tripsina y subtilisina) de la leche de cabra y de sus proteínas, caseínas y proteínas séricas. Las fracciones proteicas se obtuvieron mediante ultrafiltración con membranas cerámicas de 0.14 μm . En el caso de la leche de cabra, se han optimizado las condiciones de operación que maximizan el grado de hidrólisis y la actividad inhibidora de forma independiente, y conjuntamente mediante optimización biobjetivo.

Los mejores resultados de inhibición se han obtenido para el sistema caseínas – tripsina – subtilisina. Se ha realizado la caracterización e identificación de péptidos de estos hidrolizados mediante cromatografía de exclusión de tamaños y LC-MS/MS. Las fracciones obtenidas presentaron valores IC_{50} comprendidos entre 5 y 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, se han logrado identificar 11 de los péptidos presentes en las fracciones más activas. Algunos de estos péptidos (TGPIPN, LHLPLPL, HLPLPL y EMPFPK) habían sido identificados previamente como inhibidores de ACE procedentes de caseínas, mientras que otros (WY) se han identificado por primera vez en esta investigación.

Para comprobar la resistencia de los péptidos inhibidores al proceso de digestión, los hidrolizados obtenidos con mayor capacidad inhibidora ACE se han sometido a un proceso de hidrólisis en dos etapas sucesivas con pepsina y enzimas pancreáticas, que simulan la digestión real. Se ha comprobado que los hidrolizados producidos con la combinación de enzimas mantienen su poder de inhibición de ACE, mientras que los hidrolizados obtenidos utilizando la enzima de origen animal reducen su actividad en más de un 50%.

La investigación realizada se ha completado con el estudio del proceso de purificación de los péptidos inhibidores por membranas y del proceso de secado por atomización. Para la purificación/concentración se han estudiado dos estrategias, cada una con dos etapas consecutivas. Como resultado destacable se ha obtenido que el hidrolizado de la fracción proteica de caseínas mejora un 30 % su actividad inhibidora mediante ultrafiltración a través de membrana de 50 kDa. El proceso se ajustó a un modelo de bloqueo completo de poro. Por el contrario la segunda etapa propuesta (3 kDa) no mejoró la capacidad inhibidora. Las membranas cerámicas usadas en las filtraciones recuperaron totalmente sus características filtrantes después de la limpieza alcalina empleada, lo que permite su reutilización. En el proceso de estabilización por secado por atomización, tanto la temperatura de salida del aire como el rendimiento se correlacionaron con las variables de entrada, temperatura de entrada del aire y caudal de alimentación de hidrolizado. Se obtuvo un óptimo para el rendimiento a 170 °C y 4.35 mL/min. El proceso de secado reduce en un 25 % la actividad inhibidora del hidrolizado original, pero a pesar de ello, éste mantiene un actividad inhibidora adecuada, $IC_{50} = 273.23 \mu\text{g/mL}$, para su inclusión en fórmulas para alimentación funcional.

2. Introducción

2.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

La hidrólisis enzimática de proteínas consiste en la fragmentación de las proteínas en péptidos y/o aminoácidos mediante el uso de proteasas. La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química (ácida o alcalina), entre las que cabe mencionar las siguientes:

- **Selectividad:** Las proteasas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control origina productos no deseados que pueden llegar a ser tóxicos como la lisinoalanina.
- **Condiciones moderadas de operación.** La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8. Para hidrólisis químicas normalmente se requieren altas temperaturas (superiores a 100 °C) y pH extremos (altas concentraciones de ácidos o bases).
- **El valor nutritivo permanece constante.** No se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

La hidrólisis enzimática de proteínas es, por tanto, un proceso ampliamente utilizado para la modificación de las propiedades tecnológicas de las proteínas. Como se detallará posteriormente mejora la solubilidad, adsorción, capacidad emulsificante o poder espumante. De igual forma durante la hidrólisis se modifican las propiedades inmunológicas y nutricionales ya que en el proceso se reduce la antigenicidad, se aumenta la digestibilidad y se pueden generar péptidos que actividad biológica. Éstos pueden ser empleados en la formulación de alimentos con alto valor añadido (alimentos funcionales). Todo estos cambios se producen sin pérdida del valor nutritivo, lo que hace que sea un proceso muy atractivo para la industria agroalimentaria. Se pueden encontrar hidrolizados de proteínas en alimentos preparados, productos dietéticos o en nutrición infantil y clínica.

2.1.1. Química del enlace peptídico

La hidrólisis de proteínas consiste en la ruptura del enlace peptídico que une los aminoácidos de la cadena peptídica, consumiendo una molécula de agua por cada enlace roto.



Las enzimas proteolíticas catalizan el proceso de fragmentación de las proteínas. Los productos liberados pueden volver a ser fragmentados, de esta forma se podrían distinguir diferentes especies intermedias según el tamaño molecular de los fragmentos y su solubilidad:



De acuerdo con Svendsen et al. (1976) la catálisis de las serinoproteasas, la principal clase de proteasas, se produce en 3 reacciones consecutivas. Primero, se forma el complejo Michaelis de substrato-enzima, luego el enlace peptídico se rompe liberándose uno de los fragmentos peptídicos, por último el otro fragmento abandona la enzima debido al ataque nucleofílico de una molécula de agua quedando la enzima libre para una nueva reacción. Si la reacción se produce en medio acuoso de forma que se puede desprejar la reacción inversa, la secuencia de reacciones puede ser simplificada como se representa en el esquema de la Figura 2.1.

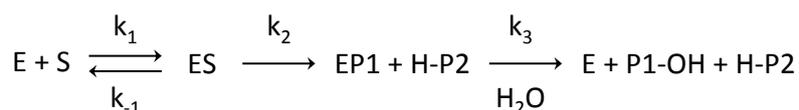
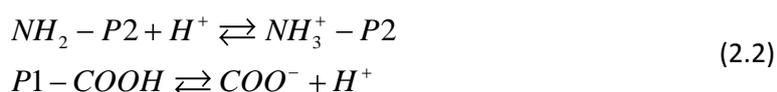


Figura 2.1. Mecanismo de catálisis de las serinoproteasas. E: enzima; S: sustrato; P1 y P2: péptidos resultantes; k: constante de velocidad.

Al romperse el enlace peptídico se liberan los grupos amino y carboxilo terminal, que formarán los siguientes equilibrios ácido-base:



Los grupos amino y carboxilo se encontrarán más o menos disociados dependiendo del pH del medio. Los valores de pK a 25 °C de ambos grupos en el polipéptido se estiman que están entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8, respectivamente (Steinhardt y Beychok, 1964; Rupley, 1967). Por tanto, el grupo carboxilo estará protonado a pH inferior a 2, parcialmente disociado entre pH 2 y 5 y totalmente disociado para pH mayor de 5. El grupo amino por su parte, se encontrará protonado a pH menor de 6, parcialmente protonado entre pH 6 y 9.5 y desprotonado para pH 9.5 o superior. Debido a esto, durante la hidrólisis de proteínas se producirá una liberación o captación de protones, lo que genera cambios en el pH. Sólo en la franja de pH comprendida entre pH 5-6 podrían compensarse la generación y el consumo de protones de forma que el pH permaneciera constante. Para el resto de casos, cuando la hidrólisis se produce a valores de pH

fuera del rango dado por los valores de pK de los grupos amino y carboxilo, será necesaria la adición de base o de ácido para mantener constante el pH.

Para determinar la extensión de la reacción de hidrólisis se emplea el parámetro grado de hidrólisis (DH). Éste se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína. Para su determinación se emplean distintos métodos entre los que destaca el método del pH-estato basado en la valoración del protón liberado tras la ruptura del enlace peptídico a determinados valores de pH. Es el único que permite una medida continua del grado de hidrólisis.

2.1.2. Propiedades de los hidrolizados

La hidrólisis de proteínas induce cambios en las propiedades moleculares de la proteína como la disminución del peso molecular, incrementos de carga o exposición de grupos hidrofóbicos. Estos cambios generan modificaciones tanto en las propiedades tecnológicas como en las nutricionales y fisiológicas (Nielsen, 1997)

2.1.2.1. Propiedades tecnológicas

Se ha comprobado que la longitud de la cadena peptídica que compone la proteína influye de manera notable en las propiedades tecnológicas (Adler-Nissen, 1979), especialmente en el poder emulsificante y la capacidad espumante. Muchos autores han descrito cómo las propiedades emulsificantes mejoran después de una hidrólisis controlada. Por ejemplo, Chobert et al. (1988) estableció que para mantener unas buenas propiedades emulsificantes se debe mantener péptidos con pesos moleculares no inferiores a 5000. En la misma línea Tunçturk y Zorba (2006) comprobaron como la hidrólisis limitada de caseína mejoraba la emulsión formada y su densidad, sin embargo, una hidrólisis mayor provocaba la desaparición de estas mejoras. Esto puede ser debido a que para grados de hidrólisis bajos se produce un aumento en la proporción de radicales hidrofóbicos expuestos al medio lo que facilita la formación de emulsiones (Kato y Nakai, 1980). Al contrario que para la capacidad emulsificante, grados de hidrólisis elevados favorecen la capacidad espumante de los hidrolizados, sin embargo, la espuma formada disminuye su estabilidad (Halling, 1981)

La solubilidad de las proteínas es una de las propiedades más importantes a la hora de incluir el hidrolizado en fórmulas alimenticias. De forma general, la solubilidad aumenta al producirse la hidrólisis, debido a la reducción del tamaño molecular y a la exposición al medio de un mayor número de grupos polares (Chobert et al., 1988; Abert y Kneifel, 1992).

2.1.2.2. Propiedades nutricionales y fisiológicas

Como ya se ha indicado, el proceso de hidrólisis no afecta al valor nutritivo de la proteína, sin embargo aumenta su digestibilidad y favorece su absorción intestinal. Ya que los péptidos de pequeño tamaño presentan una mayor digestibilidad que las proteínas nativas. Por lo que el uso de proteínas hidrolizadas puede resultar muy beneficioso en personas con problemas digestivos tales como fibrosis quística, pancreatitis o síndrome del intestino corto (Frokjaer, 1994; Schmidl et al., 1994).

Otra de las mejoras que la hidrólisis puede inducir en las proteínas es la eliminación de su capacidad antigénica. Como es conocido, el consumo de proteínas puede dar lugar a la aparición de reacciones alérgicas en algunas personas y especialmente en niños. La hidrólisis reduce la antigenicidad de las proteínas ya que durante el proceso se destruyen los fragmentos de la proteína con capacidad para desencadenar la respuesta inmune. Para conseguir un hidrolizado hipo-antigénico se deben conseguir grados de hidrólisis elevados de forma que los tamaños moleculares de los péptidos sean pequeños (<1000 Da). (Otani y Hosono, 1989; Wroblewska et al., 2004)

Uno de los problemas que presenta el proceso de hidrólisis es que durante el mismo pueden generarse péptidos que otorgan al hidrolizado un sabor desagradable. Esto es debido principalmente a la presencia de péptidos hidrofóbicos de pequeño tamaño (Lovsin Kukman et al., 1996). La aparición de amargor depende del tipo de proteína y de la especificidad de la enzima. Por ejemplo para caseínas los mayores grados de amargor se presentan para DH bajos, mientras que la gelatina prácticamente no desarrolla amargor en ningún caso. En cuanto a las enzimas, aquellas como la tripsina, que rompen específicamente por aminoácidos hidrofílicos generan menores grados de amargor (Nielsen, 1997). De forma general y del mismo modo que los problemas de antigenicidad, el sabor amargo de los hidrolizados desaparece para péptidos de tamaño inferior a 1000 Da (Otani y Hosono, 1989)

Además de las propiedades nutricionales que poseen, algunos de los péptidos generados durante la hidrólisis han demostrado tener un efecto beneficioso sobre el organismo. Estos péptidos tienen que ser liberados de la estructura de la proteína para llegar a ser activos y ejercer su efecto sobre el organismo. Se han identificados numerosos péptidos bioactivos en distintas proteínas alimentarias. Entre ellas, las proteínas lácteas han sido ampliamente estudiadas (Schlimme & Meisel, 1995; Korhonen et al., 1998; Xu, 1998; Clare & Swaisgood, 2000; Pihlanto Leppala, 2001; Jäkälä y Vapaatalo, 2010). También las proteínas de pescado, carne, cereales, huevos, etc (Kitts y Weiler, 2003; Vercauteren et al., 2005) Los péptidos

generados a partir de proteínas alimentarias presentan capacidades fisiológicas muy variadas: antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, opioide, antitrombótica, anticolesterolémica, inmunomoduladora (Korhonen & Philanto, 2003; Hartmann y Meisel, 2007)

Una de las actividades más estudiadas debido a la importancia de las enfermedades cardiovasculares es la actividad antihipertensiva. En apartados posteriores se explicará en detalle todo lo relacionado con los péptidos antihipertensivos.

2.1.3. Aplicaciones de los hidrolizados

Los cambios en las propiedades de las proteínas como consecuencia de la hidrólisis abre el campo de aplicación de los hidrolizados en la industria alimentaria:

- 1) Modificación de las propiedades de los alimentos. Los hidrolizados de bajo peso molecular son empleados como texturizantes especialmente en panadería, bollería, heladería y elaboración de salsas. Por otro lado, los hidrolizados de alto grado de hidrólisis se emplean frecuentemente como potenciadores del sabor (principalmente en sopas, salchichas, alimentos precocinados y productos cárnicos).
- 2) Formulación de dietas. Debido a la mejora de las propiedades nutricionales (mejor digestibilidad y baja antigenicidad) los hidrolizados de proteínas se emplean como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas. Especialmente importante es su aplicación en dietas entéricas, diseñadas para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa que son fundamentales para enfermos con desórdenes digestivos.
- 3) Formulación de alimentos funcionales. Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de su efecto nutritivo, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad (Diplock et al., 1990). Esta definición es la que propone el FUFOSE (Functional Food Science in Europe), y en ella cabe destacar 3 aspectos importantes: 1) el efecto funcional es distinto al nutritivo, 2) debe demostrarse satisfactoriamente y 3) puede consistir en una mejoría de las funciones fisiológicas (incluyendo funciones psicológicas como el bienestar) o en reducción del riesgo de desarrollar un proceso patológico.

Este último punto ha alcanzado gran relevancia en los últimos años debido a que los avances en nutrición ponen de manifiesto la relación entre alimentación y salud (Appel et al., 1997; W.H.O., 2003). Los consumidores conscientes de ello, valoran positivamente aquellos

alimentos que les aportan algún beneficio para su salud, bien sea para el tratamiento o prevención de problemas de salud o tan sólo para alcanzar “bienestar”.

El uso de péptidos con fines médicos ha sido una práctica común, ya en 1994 se comercializaban al menos 100 fórmulas alimentarias diseñadas específicamente para pacientes con algún problema digestivo (Schmidl et al., 1994). Actualmente, la agencia europea de seguridad alimentaria (EFSA) es la responsable de conceder las licencias para comercializar productos bajo afirmaciones relativas a la posesión de algún efecto beneficioso para el organismo. Este organismo exige estudios científicos de calidad que abalen el efecto sobre el organismo del compuesto que se va a comercializar..

2.2. HIPERTENSIÓN

La hipertensión es un trastorno que se caracteriza por la presión sanguínea continuadamente alta, constituyendo una de las enfermedades crónicas más frecuentes. La importancia de la hipertensión radica en que, si no se controla, puede conducir a sufrir graves problemas de salud. La presión sanguínea es la fuerza ejercida por la sangre sobre los vasos sanguíneos, está determinada por la cantidad de sangre bombeada por el corazón y por el tamaño y condición de las arterias. Se puede distinguir entre dos tipos de lecturas, la presión sistólica (SBP) y la diastólica (DBP), medidas en milímetros de mercurio (mmHg). La primera se refiere a la fuerza de la sangre expulsada del corazón cuando éste late para bombearla alrededor del cuerpo, y la diastólica tiene lugar cuando el corazón se está llenando de nuevo con sangre en preparación para el siguiente latido.

No hay un valor concreto de presión sanguínea a partir de la cual comiencen las complicaciones renales y cardiovasculares, por tanto, establecer unos valores de presión sanguínea a partir de los cuales se considera a una persona hipertensa es algo arbitrario, aunque necesario para poder asesorar y tratar a los pacientes (Carretero y Oparil, 2000). Instituciones como la Organización Mundial de la Salud, la Sociedad Internacional de Hipertensión o las Sociedades Europeas de la Hipertensión y Cardiología, elaboran guías en las que se define y clasifica la hipertensión. Las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología presentaron en 2009 una reevaluación de la Guía Europea de manejo de la Hipertensión Arterial (Mancia et al., 2009). En la guía se recomienda empezar con el tratamiento farmacológico al padecer una hipertensión grado 1 (ligera), que estaría comprendida entre 140 - 159 mmHg de presión sistólica y 90 – 99 mmHg de presión diastólica.

Algunos de los factores que favorecen el aumento de la presión sanguínea son la obesidad, la resistencia a la insulina, alto consumo de alcohol, alto consumo de sal, edad y muy posiblemente el sedentarismo, el estrés y el bajo consumo de potasio y calcio (Carretero y Oparil, 2000).

En un estudio llevado a cabo por Kearney et al. (2005) analizando datos de diversas regiones del mundo, se estimó que en el año 2000 un 26.4 % de la población adulta tenía hipertensión, lo que supone unos 972 millones de personas, en los países desarrollados 333 millones y en los países en vías de desarrollo unos 639 millones. Para el año 2025 prevé que la cifra de afectados se incrementará un 60 % hasta los 1.56 billones de afectados. La hipertensión se está extendiendo de forma alarmante desde los países desarrollados a las economías emergentes como India y China.

La hipertensión tiene consecuencias muy negativas para la salud, por un lado, es un factor de riesgo para enfermedades renales, provocando cambios estructurales y en la función del sistema vascular del riñón (Ruilope, 1999) y por otro es el mayor factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (Collins R. y MacMahon, 1994; Kannen, 2000; Mancia et al., 2009). Entre estas últimas cabe destacar la enfermedad arterial coronaria, arritmia cardíaca, accidente cerebrovascular o infarto. De acuerdo con la Organización mundial de la salud, las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la principal causa de muerte en el mundo, en 2008 murieron 17.3 millones de personas por algún tipo de enfermedad cardiovascular, lo que representa un 30 % del total de muertes. De estas muertes 7.3 millones se debieron a ataques al corazón y 6.2 millones debido a apoplejías. La OMS estima que de continuar esta tendencia, en 2030, 23.6 millones de personas podrían morir debido a enfermedades cardiovasculares (WHO 2011).

Para el control de la hipertensión se han desarrollado diferentes tipos de fármacos, los grupos más importantes son los diuréticos, los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), antagonistas del calcio, antagonistas del receptor de la angiotensina y beta-bloqueadores. Éstos suelen ser empleados conjuntamente para tratar el problema desde distintos frentes. Las guías para el tratamiento de la hipertensión de la sociedad europea de hipertensión recogen las recomendaciones para su uso.

2.2.1. La enzima convertidora de la angiotensina

Una de las vías para reducir la presión sanguínea es la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA, ACE) mediante inhibidores de la misma. En 1956, se descubre la enzima

responsable de la aparición de la angiotensina II (Skrbic y Igic, 2009), una de las moléculas más importantes implicadas en la hipertensión (Touyz, 2005).

ACE (peptidil-dipeptidasa A o cininasa II), es una dicarbopeptidasa que contiene Zn^{2+} en su molécula y cuyo centro activo necesita altas concentraciones de cloruros para activarse (Hong et al., 2008; Riordan, 2003). Es capaz de hidrolizar una amplia variedad de sustratos actuando tanto como exoenzima como endoenzima (Sturrock et al., 2004). La principal actividad consiste en liberar el dipéptido del C-terminal en péptidos entre 3 y 20 aminoácidos (Li et al., 2004).

La importancia de ACE en la regulación de la presión sanguínea se debe a que participa en dos importantes mecanismos bioquímicos (Johnston, 1992; Campbell, 2003). Por un lado actúa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona transformando un polipéptido de 10 aminoácidos sin actividad presora llamado angiotensina I, cuya secuencia de aminoácidos es: Asp-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pro-Pphe-His-Leu. La enzima convertidora de angiotensina I (ACE), presente en el plasma, libera el dipéptido His-Leu del extremo C-terminal de la angiotensina I, dando lugar al octapéptido Asp-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pra-Phe, denominado angiotensina II que posee una potente actividad vasoconstrictora. Además, está relacionado también con la liberación de aldosterona, un esteroide que aumenta la tensión arterial al aumentar el Na^+ y la retención de agua. Además ACE ejerce su acción sobre el sistema calicreína-cinina, catalizando la degradación de la bradiquinina, un péptido que originalmente disminuye la presión arterial y estimula la musculatura lisa, pero que al ser degradado pierde sus propiedades vasodilatadoras. Por otro lado, se ha descubierto que ACE degrada neuropéptidos como neurotensinas y encefalinas, que pueden interactuar con el sistema cardiovascular (Johnston, 1992). En la Figura 2.2 se esquematiza el mecanismo de actuación de ACE sobre los dos sistemas anteriormente mencionados.

La enzima se encuentra ampliamente distribuida en el cuerpo como en cerebro, corazón, pulmones, hígado, riñones, tracto gastrointestinal, páncreas, bazo, testículos, glándula pituitaria, etc (Murray y FitzGerald, 2007). La mayor parte (90 %) se encuentra como ectoenzima ligada a la membrana de las células del endotelio vascular. Además de la forma ligada a la membrana hay una forma libre de ACE, que se encuentra básicamente en fluidos biológicos (Elisseeva y Kugaevskaya, 2009; Sibony et al., 1993)

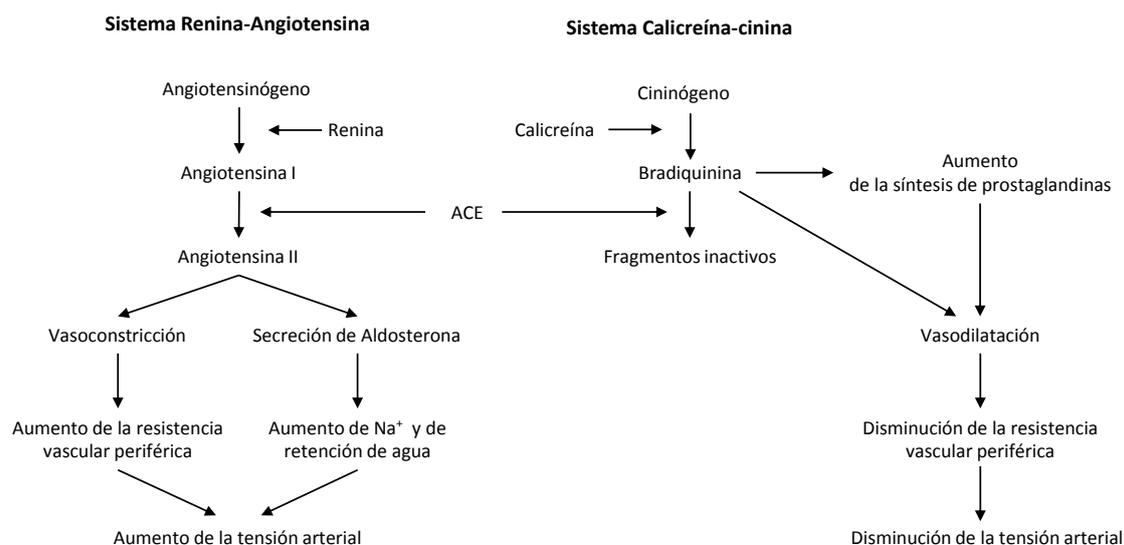


Figura 2.2. Papel de la enzima convertidora de la angiotensina en la regulación de la presión sanguínea (Li et al., 2004).

Existen dos isoformas de ACE, ambas transcritas por el mismo gen. La de mayor tamaño posee 1277 aminoácidos, está presente en la mayoría de tejidos y se conoce como ACE somática. La de menor tamaño está compuesta por 701 aminoácidos, se encuentra en los testículos de adultos y se le denomina ACE testicular (Natesh et al., 2003). ACE somática posee dos dominios catalíticos, dominio C- y dominio N-, cada uno con distintos sitios activos y distintas propiedades funcionales y fisicoquímicas. Los dos dominios difieren tanto en especificidad hacia sustratos o inhibidores como en activación por cloruros (Pina y Roque, 2009). No obstante, se ha demostrado que al inhibir el dominio N con un inhibidor selectivo, no varía en absoluto la presión sanguínea, lo que sugiere que el dominio del C es el determinante para convertir la angiotensina I (Natesh et al., 2003). El dominio N se encarga de romper preferentemente la bradiquinina y otros péptidos (Riordan, 2003). ACE testicular muestra un solo dominio que es esencialmente idéntico al dominio C de ACE somática (Riordan, 2003; Pina y Roque, 2009)

2.2.2. La inhibición de ACE

El desarrollo de compuestos capaces de inhibir a la enzima convertidora de la angiotensina comenzó a raíz del descubrimiento hecho por los doctores Ferreira y Rocha e Silva (Universidad de São Paulo) en 1965, cuando describieron un factor potenciador de la bradiquinina en el veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Posteriormente se determinó que este factor era un potente inhibidor de ACE (Skrbic y Igic, 2009) y se comenzaron a aislar y caracterizar algunos de los péptidos del veneno. El inhibidor más potente resultó ser un

nonapéptido (pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro), también denominado teprotide (Ferreira, 2000). Otro de los péptidos identificados, un pentapéptido, sirvió como base a Squibb Company para desarrollar el primer inhibidor oral para ACE, el captopril (Ferreira, 2000). Los péptidos inhibidores de mayor uso hoy en día, como captopril, lisinopril, ramipril o enalapril, son potentes inhibidores del dominio C- y del N- de ACE (Pina y Roque, 2009).

Actualmente, estos medicamentos inhibidores de ACE se usan de forma general para el control de la hipertensión y, en países desarrollados como EE.UU., suponen un gasto anual de aproximadamente 15 billones de dólares (Hong et al., 2008). Sin embargo, el uso continuado de estos fármacos tiene consecuencias desfavorables. Por ejemplo, se ha determinado que estos fármacos tienen efectos secundarios, tales como tos seca que puede ser tan debilitante que en ciertos casos tiene como consecuencia el cese del tratamiento (Coulter y Edwards, 1987; Riordan, 2003). Otros efectos negativos identificados en pacientes tratados con estos fármacos han sido hipotensión, incremento de los niveles de potasio, reducción de la función renal o erupciones cutáneas (FitzGerald et al., 2004). Un efecto mucho más peligroso es el angioedema, que tiene una incidencia de 0.1-0.5 %, pero puede poner en riesgo la vida del paciente (Adam et al., 2002). Por tanto, es deseable una alternativa segura que no tenga estos efectos secundarios, como podría ser la utilización de péptidos derivados de proteínas de alimentos con actividad antihipertensiva que no presentan efectos adversos para la salud (Takano, 2002; Riordan, 2003). Estos péptidos han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la hipertensión, como demuestran estudios *in vivo* con ratas espontáneamente hipertensas y estudios en humanos con péptidos antihipertensivos o alimentos que los contenían (FitzGerald et al., 2004; Korhonen, 2009).

Además de su uso para el control de la hipertensión, recientes investigaciones (Hanif et al., 2010) ponen de manifiesto otros efectos beneficiosos de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina por parte de estos péptidos, como son la inhibición de eventos isquémicos, la estabilización de plaquetas o el retraso en la progresión de la nefropatía y neuropatía diabética. Además de la vasoconstricción, la angiotensina II induce estrés oxidativo y promueve la inflamación, por tanto, los inhibidores de ACE además de disminuir la presión sanguínea pueden reducir la especies de oxígeno reactivas para mejorar las funciones endoteliales (Aluko et al., 2007). Así mismo, la excesiva actividad de Angiotensina II parece estar detrás del desarrollo de diabetes o complicaciones de la misma (Bindom y Lazardigues, 2009), por lo tanto, la inhibición de ACE resultaría beneficiosa también para este tipo de enfermedad. Además, estudios todavía en curso apuntan a un efecto protector tanto en desórdenes relacionados con la memoria y el cáncer (Hanif et al., 2010)

2.2.3. Métodos para la determinación de la actividad inhibidora de ACE

Existen diversos métodos para el análisis de la capacidad inhibidora *in vitro*. Estos métodos otorgan una medida del potencial efecto antihipertensivo de los compuestos, lo que es muy útil a la hora de seleccionar entre distintos hidrolizados o péptidos en las etapas iniciales de una investigación. Sin embargo, para poder afirmar que un péptido tiene un efecto antihipertensivo, éste debe demostrar su actividad en ensayos *in vivo*.

2.2.3.1. Métodos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* para medir la actividad inhibidora de ACE implican la determinación de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina con sustratos sintéticos. Usualmente estos sustratos son di- o tripéptidos modificados que permiten la medida de los mismos o de sus productos de hidrolizados mediante métodos espectrofotométricos, radioisotópicos, fluorométricos y cromatográficos (Vermeirssen et al., 2004)

Aunque los métodos espectrofotométricos son los más ampliamente utilizados, algunos métodos fluorométricos están ganando relevancia. En general los métodos fluorométricos se basan en la hidrólisis de un sustrato que contiene un grupo fluorescente que es liberado por la acción de ACE. Sentadreu y Toldrá (2006) propone un método en microplacas usando como sustrato *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-L-phenylalanyl-proline (ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro) que contiene un grupo fluorescente (ABZ-Gly). El ensayo se realiza a pH 8.3, usando un buffer 50 mM Tris-base con 1.125 M NaCl para disolver el sustrato (0.45mM). Las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas se establecen en 355 y 405 nm, respectivamente. La microplaca se incuba a 37 °C y se realizan medidas cada 15 min durante 1 h. El aumento de fluorescencia se relaciona con la actividad enzimática.

Dentro de los ensayos espectrofotométricos, destacan especialmente los métodos originalmente propuestos por Cushman y Cheung y por Holmquist que emplean como sustratos los tripéptidos sintéticos hipuril-L- histidil-L-leucina (HHL) y N-[3-(2-Furil)acriloil]-L- fenilalanina-glicil-glicina (FAPGG), respectivamente.

El método de Cushman y Cheung (1971) se basa en la hidrólisis de hipuril histidil leucina (HHL) mediante ACE, de la que se obtiene como productos ácido hipúrico y el dipéptido histidil leucina. El ácido hipúrico se extrae con acetato de etilo para posteriormente cuantificarlo mediante la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro a 228 nm. En el ensayo original, la enzima utilizada fue obtenida de un extracto de acetona de pulmón de conejo. Las

condiciones óptimas para el ensayo que se establecieron fueron las siguientes: pH de 8.1-8.3 con buffer de fosfato potásico 100mM, concentración de iones cloruros de 300 mM y una concentración de sustrato de 5-10 mM. El método consiste en incubar a 37 °C durante 30 min la enzima con el sustrato en presencia de distintas concentraciones de inhibidor. La hidrólisis se detiene con HCl 1N y el ácido hipúrico formado se extrae con acetato de etilo. Posteriormente se evapora el acetato de etilo y se redisuelve el ácido hipúrico en agua en la que se determinará la absorbancia a 228 nm. La cantidad de ácido hipúrico originado por la hidrólisis del sustrato se relaciona directamente con la actividad ACE. La producción de ácido hipúrico a partir de HHL es lineal al menos durante los primeros 30 min con cantidades de enzima mayores de 12 mU (Cushman y Cheung, 1971).

Los autores de este ensayo también definieron el concepto de unidad de actividad (U) de la enzima convertidora de angiotensina para el ensayo espectrofotométrico, que se define como la cantidad de la misma que cataliza la formación de 1 μmol de ácido hipúrico en 1 min a 37 °C bajo las condiciones estándar del ensayo.

Este método presenta algunos inconvenientes. Como se ha detallado anteriormente el método consta de un número considerable de etapas. Además, algunas de estas etapas requieren un tiempo elevado para obtener una cantidad significativa de producto. Todo ello hace que se incremente considerablemente el tiempo global necesario para analizar cada muestra. Sin embargo, el mayor inconveniente del ensayo se encuentra en la etapa de extracción. Durante esta operación, además del producto de hidrólisis (HA), el solvente puede arrastrar HHL que absorbe fuertemente a 228 nm (Cushman y Cheung, 1971; Wu et al., 2002), lo que supone una importante fuente de error.

Posteriormente surgen modificaciones a este método. Algunos autores realizan modificaciones en la composición de buffer, la relación enzima sustrato o el volumen de reacción (Hernández-Ledesma, 2003). Otros autores varían la última etapa, con la intención de eliminar las interferencias que puede generar la extracción con acetato. Una de estas modificaciones consiste en la utilización de 2, 4, 6-tricloro-triazina en dioxano para la determinación del ácido hipúrico sin necesidad de separación posterior (Hayakari et al., 1978). Otro método para medir espectrofotométricamente el ácido hipúrico es usar cloruro de bencenosulfonilo que origina una reacción colorimétrica específica, un método normalmente usado para determinaciones de este ácido en orina (Li et al., 2005). Otra de las posibilidades estudiadas consiste en la separación cromatográfica después de la inactivación de la enzima, para cuantificar el ácido hipúrico (Wu et al., 2002).

El ensayo para determinar la actividad de ACE propuesto por Holmquist et al. (1979) basado en la hidrólisis del sustrato: N-[3-(2-Furil)acrilóil]-L-fenilalanina-glicil-glicina (FA-PGG) fue adaptado como test para medir la actividad antihipertensiva de péptidos (Vermeirssen et al., 2002a). En el ensayo original ACE hidroliza el sustrato generando por un lado N-[3-(2-Furil)acrilóil]-L-fenilalanina (FAP) y por otro el dipéptido glicil-glicina (GG), lo que produce un descenso en la absorbancia. En general, la hidrólisis de los tripéptidos sintéticos (con grupo FA) se puede monitorizar en un rango muy amplio de concentraciones de sustrato, para una concentración de 0.02 mM la medida se realiza a 328 nm mientras que para concentraciones altas como 3 mM se mide a 352nm. La medida de la actividad ACE con FAPGG como sustrato es un método sensible para concentraciones de sustrato por encima de la constante de Michaelis-Menten ($K_M = 0.3 \text{ mM}$). En estas condiciones la hidrólisis responde a una cinética de orden cero, en la que la velocidad de reacción es independiente de la concentración de sustrato y directamente proporcional a la concentración de enzima, además, la hidrólisis es lineal con el tiempo durante al menos el 15 % del tiempo total de hidrólisis. Holmquist et al. (1979) usa como fuente de ACE extracto de acetona de pulmón de conejo y establece un pH óptimo de 7.5 con 0.05 M buffer Tris-HCl y una concentración de NaCl de 0.3 M.

Posteriormente el método se estandariza para la medida de la actividad de ACE en suero. La medida se realiza a 37 °C, usando la longitud de onda de 340 nm ya que es ésta a la que trabajan muchos de los equipos automáticos de medida (Harjanne, 1984). El pH se establece en 8.2 con buffer borato con 0.3 M de NaCl y la concentración de sustrato en la reacción es de 0.73 mM. Vermeirssen et al. (2002a) transforman el ensayo para la determinación de actividad de ACE en un ensayo de inhibición de ACE y lo optimizan usando extracto de acetona de pulmón de conejo y la relación enzima-sustrato apropiada. El método adaptado para la determinación de la inhibición de ACE es básicamente igual que los propuestos anteriormente, con la diferencia de que a la mezcla de reacción se añade el inhibidor en estudio a distintas concentraciones. En el recipiente de reacción se introduce el sustrato FAPGG y el inhibidor junto con buffer y NaCl que aseguran un pH y una concentración de cloruros adecuado para maximizar la actividad enzimática, posteriormente se añade la enzima y comienza la reacción, que se desarrolla a 37 °C.

Las condiciones del ensayo varían de unos autores a otros, pero de forma general se establece un valor de pH de 8.1-8.3, la concentración de NaCl es 0.3 M, necesaria para una mayor actividad de la enzima (Cushman y Cheung, 1971; Holmquist et al., 1979). La absorbancia se mide a 340 nm, observándose un descenso lineal en la absorbancia con el tiempo para concentraciones de sustrato mayores 0.3 mM (Holmquist et al., 1979). Este descenso se

relaciona con la actividad de la enzima y normalmente el tiempo de medición no excede de los primeros 30 min.

Una reciente modificación a este método consiste en el empleo de microplacas y de lector espectrofotométrico de microplacas (Shalaby et al., 2006). Este método permite reducir los volúmenes de reacción, realizar un elevado número de determinaciones simultáneas y tener un seguimiento continuo de la reacción de hidrólisis, consiguiéndose de este modo un ahorro económico y de tiempo.

Los métodos espectrofotométricos son en general más sencillos y no se ven afectados por los problemas inherentes a los métodos fluorescentes como presencia de contaminantes, fotodescomposición de fluorocromo o ausencia de estándares (Holmquist et al., 1979). Comparando los dos sustratos usados en los métodos espectrofotométricos, el sustrato FAPGG presenta mejores prestaciones que HHL, ya que tiene alta solubilidad, alta estabilidad y un valor de K_m 8 veces menor que el de HHL. Por otra parte, los dipéptidos liberados por FAPGG no inhiben a ACE (Holmquist et al., 1979). Comparando los procedimientos de análisis, en el método con FAPGG no son necesarias extracciones ni separaciones de ningún tipo, lo que simplifica enormemente el método. Además de la simplicidad, sensibilidad y exactitud son las principales ventajas.

Generalmente el parámetro utilizado para comparar la actividad inhibidora de distintos compuestos es el IC_{50} , que se define como la concentración de inhibidor que provoca un descenso del 50 % en la actividad de ACE. Valores de IC_{50} bajos indican una buena actividad inhibidora de ACE ya que es necesaria una concentración muy pequeña de sustancia inhibidora para disminuir la actuación de la enzima. Hay que tener en cuenta que el valor IC_{50} obtenido para un mismo inhibidor, varía según sea el origen de ACE o según sea el sustrato utilizado en el ensayo (Vermeirssen et al., 2002a). Además, para obtener resultados comparables y reproducibles es fundamental controlar los niveles de actividad ACE en los ensayos (Murray et al., 2004).

2.2.3.2. Métodos *in vivo*

Que un péptido tenga un alto poder inhibidor *in vitro*, no garantizan que se mantengan activos *in vivo*. Ya que en los ensayos *in vitro* no se tiene en cuenta importantes factores como las transformaciones fisiológicas que sufren los péptidos (Vermeirssen et al., 2004). Los efectos *in vivo* de los péptidos son testados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), que constituyen un modelo aceptado para la hipertensión humana. En muchos casos el resultado de estos ensayos pone de manifiesto las diferencias entre actividad *in vitro* y el efecto que

producen *in vivo* (FitzGerald et al., 2004). Los ensayos *in vivo* permiten diferenciar los inhibidores de ACE de los péptidos antihipertensivos (Saito, 2008). Los estudios en humanos son el último paso para comprobar la seguridad y eficacia antihipertensiva de los péptidos.

Los estudios en ratas suelen llevarse a cabo en condiciones de temperatura y humedad controladas (Wang et al., 2008; He et al., 2008). El péptido se administra disuelto en una matriz, como puede ser una disolución salina, o bien incluido en leche fermentada. En estos estudios se suelen emplear 3 tipos de ratas:

- a) Grupo control positivo, a las que se les administra un medicamento contra la hipertensión de comprobada eficacia, como puede ser el captopril.
- b) Grupo control negativo, a cuyas ratas se les administra la matriz sin componentes antihipertensivos.
- c) Grupo de estudio, a las que se les administra el péptido o la fracción peptídica que queremos estudiar.

En ocasiones se utilizan ratas Wistar-Kyoto (WKY), con tensión arterial normal, para ver el efecto que los péptidos antihipertensivos tienen sobre individuos con tensión sanguínea normal. Se establecerían dos grupos: un grupo control negativo y otro grupo de estudio.

Se pueden realizar estudios a corto plazo, en los que se alimenta a las ratas con el péptido en la dosis deseada y se mide la presión sanguínea antes de la ingesta y a las 2, 4, 6 y 8 h. después de la administración. En los estudios a largo plazo, se administra oralmente la dosis deseada de péptido durante varios días, normalmente a una hora determinada, y se va registrando cómo varía la presión. El método más habitual para tomar la presión sanguínea es el método del manguito en la cola, que se realiza siempre en las mismas condiciones. Otro método empleado es implantar un catéter en la arteria femoral que permite registrar la presión sanguínea y el ritmo cardiaco del animal de forma continua (Davis et al., 2001). Este método presenta la ventaja de que no requiere sujetar al animal, lo que se cree que es una de las causas de la gran variabilidad que presentan en algunas ocasiones las medidas obtenidas mediante el método del manguito de cola.

En algunas ocasiones, se sacrifica al animal una vez finalizado el tratamiento para medir los niveles de péptidos antihipertensivos en estudio y la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina en distintas partes del organismo: aorta, pulmón, riñón, corazón y cerebro (Masuda et al., 1996; Sánchez et al., 2011). Para el análisis de estas muestras se emplean

métodos *in vitro* como los indicados anteriormente. Además, también se llegan a medir otros parámetros como hipermetropía cardíaca o composición lipídica (Aluko et al., 2007)

El siguiente paso en el estudio de los péptidos inhibidores es comprobar su efecto en humanos. Estos ensayos se realizan con personas que sufren hipertensión y que aceptan voluntariamente participar en los estudios. Normalmente se excluyen personas que puedan tener desórdenes de la función hepática, renal o en el sistema cardiovascular, respiratorio o endocrino, tampoco personas con diabetes no controlada (Hirota et al., 2007; Ishida et al., 2011). También es posible ampliar el estudio con individuos sanos, comprobando de esta forma cómo les afecta la ingesta de estos péptidos. Estos estudios se realizan mediante el método del doble ciego, que pretende evitar el sesgo tanto de los participantes como del propio investigador. Los sujetos se dividen aleatoriamente en dos grupos, a unos se les suministra el péptido o hidrolizado que se pretende estudiar, al otro grupo se les suministra un placebo. Tanto las muestras activas como el placebo se suelen preparar en pastillas que los individuos irán tomando de acuerdo con las indicaciones suministradas.

Se observa cómo varía la presión sanguínea durante varias semanas y si se producen efectos secundarios de algún tipo. Las medidas de presión sanguínea se realizan siempre en las mismas condiciones y siguiendo el mismo procedimiento con el fin de obtener medidas comparables. Normalmente se registra también cómo evoluciona el peso del individuo. Otras pruebas como análisis de sangre y orina, electrocardiogramas, etc. suelen realizarse al menos al comienzo y al final del experimento.

2.3. PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ACE DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE ALIMENTOS

Desde los primeros péptidos antihipertensivos identificados en el veneno de serpiente, muchos péptidos inhibidores de ACE han sido descubiertos después. Entre ellos, los derivados de proteínas de alimentos, incluyendo péptidos de origen animal o vegetal. Las secuencias de péptidos antihipertensivos contenidas en las proteínas deben ser liberadas de éstas para que puedan ejercer su efecto sobre la tensión arterial. Como se indicó anteriormente la hidrólisis es una de las vías para la producción de estos péptidos.

Entre las proteínas de origen vegetal en las que se han encontrado péptidos inhibidores de ACE, las proteínas de almacenamiento de cereales parecen ser unas fuentes potenciales de péptidos inhibidores de ACE (Guan y Phillips, 2009). Algunos de los péptidos de origen vegetal

encontrados provienen de proteínas de germen de trigo, gluten de maíz, proteínas de soja, proteínas de alubias, semilla de colza, proteínas de girasol, de sake y restos del arroz después de la fermentación, ajo, brócoli, espinacas, setas o algas (Guang y Phillips, 2009; Li et al., 2004; Hong et al., 2008).

La capacidad como fuente de péptidos inhibidores de ACE de las proteínas de origen animal ha sido ampliamente estudiada. Se han identificado gran número de péptidos inhibidores de ACE obtenidos a partir de proteínas musculares de carnes como pollo, cerdo o ternera y de pescados como sardina, salmón, bonito y atún entre otros (Vercruyse et al., 2005; Ryan et al., 2011). Las proteínas como actina, miosina o colágeno entre otras son el origen de estos péptidos. Otras fuentes animales de péptidos inhibidores ACE son las gelatinas (Kim et al., 2001) y las proteínas de sangre, tanto hemoglobina como proteínas del plasma (Mito et al., 1996; Hyun y Shin, 2000).

Otra fuente de proteínas animales que han mostrado su capacidad para producir este tipo de péptidos son las proteínas del huevo. La hidrólisis enzimática de ovoalbúmina y de clara de huevo generan hidrolizados con actividad inhibidora de ACE *in vitro*. De acuerdo con el estudio de You y Wu (2011) las enzimas como subtilisina y termolisina generan hidrolizados más potentes que enzimas gastrointestinales como pepsina y pancreatina.

2.3.1. Péptidos derivados de leche

Pero sin duda, entre los péptidos de origen animal, el grupo más importante es el de péptidos derivados de las proteínas lácteas (Fitzgerald y Meisel, 2000; Saito, 2008; Muro-Urista et al., 2011), ya sean obtenidos a partir de caseínas o proteínas del suero.

En los procesos de hidrólisis de proteínas lácteas se han usado un gran número de enzimas como tripsina (Tauzin et al., 2002; Pan et al., 2012), quimiotripsina (Hernandez-Ledesma et al., 2002), pepsina (Ruiz-Gimenez et al., 2012), papaína (Jiang et al., 2007), subtilisina (Geerling et al., 2006), termolisina (Hernandez-Ledesma et al., 2002; Contreras et al., 2011), proteasas obtenidas a partir de *Lactobacillus helveticus* (Maeno et al., 1996), proteinasa K (Abubakar et al., 1998). Éstas han sido usadas tanto en caseínas como proteínas del lactosuero de diversas especies como vaca, oveja, cabra e incluso especies menos comunes como el yak.

En los procesos de fermentación también se generan péptidos inhibidores de ACE (Robert et al., 2004). Así mismo durante la fermentación de quesos, las proteasas presentes pueden originar estos péptidos (Sieber et al., 2010).

Las proteínas bovinas han sido una de las fuentes de péptidos inhibidores de ACE más estudiadas. Sin embargo recientemente otros tipos de leche como la de oveja y cabra han comenzado a estudiarse como fuentes de péptidos bioactivos. La leche de cabra en concreto, presenta un contenido en proteína similar a la leche de vaca (Park et al., 2007) pero además presenta un perfil de oligosacáridos muy interesante, se han identificado glúcidos que desempeñan un importante papel preventivo frente a infecciones y en el desarrollo cerebral del lactante (Martínez-Férez et al., 2006). Por lo que la leche de cabra se presenta como un sustrato muy interesante para su aprovechamiento global en la producción de compuestos bioactivos. Este trabajo se centra en el estudio de la fracción proteica.

En la Tabla 2.1 se indican algunos de los péptidos identificados en las proteínas de la leche de cabra. Mediante hidrólisis y usando distintas enzimas, Hernández-Ledesma et al. (2002) analizaron los hidrolizados de beta-lactoglobulina caprina, entre todas las enzimas usadas, las de origen microbiano fueron las que mejores resultados ofrecieron. En el trabajo se consiguió identificar 3 péptidos del hidrolizado de termolisina con buenas actividades inhibitoras. Los péptidos MAIPPK y MAIPPKK fueron obtenidos (Manso y López-Fandiño, 2003) al digerir con tripsina macropéptidos. Éstos fueron previamente obtenidos mediante la hidrólisis de Kappa caseínas con una mezcla de quimiotripsina (85 %) y pepsina (15 %).

La importancia de estos péptidos viene dada por la presencia de la secuencia IPP que posee una gran capacidad inhibitora ($IC_{50} = 4.2 \mu M$). Los autores confirmaron además que en el proceso de digestión de estos péptidos se liberaba el tripéptido IPP, por lo que la digestión mejoraría la capacidad inhibitora. En otro estudio con hidrolizados de caseínas, Minervi et al. (2003) consiguieron identificar 2 péptidos en fracciones que poseían valores muy altos de actividad inhibitora. Los péptidos presentaban aminoácidos hidrofóbicos en el C-terminal por lo que muy probablemente sean buenos inhibidores de ACE. Al igual que los autores anteriores, Lee et al. (2005) identificaron los péptidos AYFY, PYY, YL en las fracciones más potentes del hidrolizado de caseínas de leche de cabra con pepsina. Aunque no aislaron ni produjeron sintéticamente los péptidos, por lo que no se tienen valores de su poder inhibitor concreto. Por último Geerlings et al. (2006) identificaron 3 nuevos péptidos en hidrolizados de leche de cabra, en esta ocasión producidos con subtilisina (Alcalasa). Uno de ellos TGPIPN fue el único que fue detectado al someterlos a un ensayo de permeabilidad a la membrana intestinal con células Caco-2. Además comprobaron el efecto positivo sobre ratas espontáneamente hipertensas.

Tabla 2.1. Péptidos inhibidores de ACE identificados en proteínas de leche de cabra.

TRATAMIENTO	PÉPTIDO	Nº aa	FRAGMENTO	ENZIMA / ORGANISMO	IC50 (uM)	DIGESTION ¹ /INVIVO ²	REF ³
Hidrólisis	LLF	3	β -Lg f(103–105)	Termolisina	79.8	-	1
	LVRT	4	β -Lg f(122–125)	Termolisina	2470	-	
	LQKW	4	β -Lg f(58–61)	Termolisina	34.7	-	
	LKPTPEGDN	9	β -Lg f(46–53)	Termolisina	>2700	N	
Hidrólisis	MAIPPK	6	κ -CN f(106–111)	Tripsina	-	G (+)	2
	MAIPPKK	7	κ -CN f(106–112)	Tripsina	-	G (+)	
Hidrólisis	TVDQHQ	8	α s2-CN f182-187	Proteasa Lb. helveticus	-	-	3
	LVYFPGP	8	β -CN f58-65	Proteasa Lb. helveticus	-	-	
Hidrólisis	YL	2	α s1-CN y α s2-CN	pepsin	-	-	4
	PYY	3	κ -CN	pepsin	-	-	
	AYFY	4	α s1-CN	pepsin	-	-	
Fermentación	YPF	3	β -CN f60-62	kéfir	> 1000	G	5
	IPAIN	5	k-CN f119-123	kéfir	432.6	G	
	HPFAQ	5	β -CN f50-54	kéfir	465	G (-)	
	LEIVPK	6	α s1-CN f109-114	kéfir	>1000	G	
	DKIHPF	6	β -CN f47-52	kéfir	>1000	G (+)	
	QLLKLK	6	α s1-CN f97-102	kéfir	342.4	G (-)	
	KFAWPQ	6	α s2-CN f174-179	kéfir	177.1	G	
	ENLLRF	6	α s1-CN f18-23	kéfir	82.4	G (-)	
	PYVRYL	6	α s2-CN f174-179	kéfir	2.4	G (-)	
	GPFPILV	7	β -CN f203-209	kéfir	424	G (-)	
	KIHPPAQQAQ	9	β -CN f48-56	kéfir	132.6	G (-)	
	LNVVGETVE	9	β -CN f6-14	kéfir	>1000	G (=)	
	TGPIPNLPQ	10	β -CN f63-72	kéfir	>1000	G (=)	
	LVYFPTGPIPN	11	β -CN f58-68	kéfir	27.9	G (-)	
GVPKVKETMVPK	12	β -CN f94-105	kéfir	376.1	G (-)		
GVPKVKETMVPKH	13	β -CN f94-106	kéfir	223.2	G (-)		
Hidrólisis	SLPQ	4	β -CN f84–87	Alcalasa	330	N	6
	SQPK	4	β -CN f181–184	Alcalasa	354	N	
	TGPIPN	6	β -CN f78–83,	Alcalasa	316	S	
Fermentación	QP	2	Varios frag.	Enz. Queso*	598.1	-	7
	PP	2	Varios frag.	Enz. Queso*	>1000	-	
	VRGP	4	β CN f(201–204)	Enz. Queso*	120.9	-	
	DKIHP	5	β CN f(47–51)	Enz. Queso*	113.1	-	
	DKIHPF	6	β -CN f (47–52)	Enz. Queso*	>1000	-	
Fermentación	WLAHK	5	α -La (104–108)	<i>C.parapsilosis</i> y <i>L. paracasei</i>	-	G (-)	8

*Enzimas presente en quesos, en las que se incluyen enzimas nativas de la leche, del cuajo y de cultivos starter.

¹ Digestión gastrointestinal: péptido no degradado durante digestión: G; Péptidos degradados que no pierden actividad: G (=), que mejoran: G (+); empeora actividad G (-).

² Estudios in vivo: con actividad (S) y sin actividad (N)

³[1] Hernández-Ledesma et al. (2002); [2] Manso y López-Fandiño (2003); [3] Minervi et al. (2003); [4] Lee et al. (2005); [5] Quirós et al. (2005); [6] Geerlings et al. (2006); [7] Gómez-Ruiz et al. (2006); [8] Didelot et al. (2006)

En cuanto a los péptidos identificados en productos fermentados, uno de los estudios más extensos se realizó sobre fermento de kéfir (Quirós et al., 2005). En este estudio, se identificaron 16 péptidos en leche de cabra fermentada. Muchos de los péptidos identificados disminuían ligeramente su actividad al ser sometidos a una digestión simulada. Durante la curación del queso, distintas enzimas como las de la propia leche, del cuajo o de cultivos starter añadidos hidrolizan las proteínas de la leche generando péptidos activos. Gómez-Ruiz et al. (2006) estudiaron los péptidos generados en distintos quesos. Los autores extrajeron los

péptidos e identificaron hasta 4 péptidos con actividad inhibidora de ACE en el queso de cabra. Otros autores utilizan los microorganismos responsables de la maduración del queso para realizar la fermentación y obtener así los péptidos inhibidores. Es el caso de Didelot et al. (2006) que fermentaron proteínas del lactosuero caprino con diferentes microorganismos usados en la fabricación de queso. Identificaron un péptido con actividad inhibidora, pero éste no resistió a la digestión con quimotripsina.

2.3.2. Fraccionamiento e identificación

Es evidente que a la vez que se generan péptidos activos durante la hidrólisis o fermentación también aparecen infinidad de péptidos sin la actividad concreta que se busca. Por lo tanto el producto final consistirá en una mezcla compleja de péptidos en la que sólo algunos serán activos.

Sería deseable aislar los péptidos activos para poder, bien concentrarlos y aumentar de esta forma su capacidad inhibidora o bien aislarlos individualmente para su identificación.

Usando membranas de distinto tamaño de corte es posible fraccionar el hidrolizado. Pihlanto-Leppälä et al. (1998) emplearon un proceso de ultrafiltración consistente en 2 etapas de filtración en serie, la primera con un tamaño de corte de 30 kDa y la segunda de 1 kDa para separar el hidrolizado de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. La fracción obtenida tras la membrana de 1 kDa resultó ser más activa en casi todos los tratamientos ensayados. Los hidrolizados de caseínas mejoran de igual forma su capacidad inhibidora al hacerlos pasar por una membrana de 3 kDa (Contreras et al., 2009). Un comportamiento similar fue observado en los extractos acuosos de queso filtrados a través de distintas membranas (10 y 5 kDa). Estos extractos que contienen los péptidos liberados durante la maduración, mejoraban sensiblemente su capacidad inhibidora al hacerlos pasar por las membranas más pequeñas (Pritchard et al., 2010)

En otras ocasiones el fraccionamiento se lleva a cabo mediante cromatografía de exclusión de tamaños (Otte et al. 2007a). Las columnas separan los péptidos de acuerdo a su tamaño, obteniéndose varias fracciones de distinto peso molecular en una sola etapa.

Cuando lo que se pretende es aislar los péptidos el método empleado suele ser la cromatografía líquida de alta eficacia semi-preparativa en fase reversa (RP-HPLC). Si bien esta etapa suele venir precedida por algún fraccionamiento por tamaños como los comentados anteriormente, con el fin de que la muestra presente un menor número de péptidos y facilitar

así el proceso (Ruiz-Giménez et al., 2012; Otte et al., 2007a). Para la cromatografía en fase reversa, las fases móviles empleadas suelen ser: A) una disolución acuosa de TFA (0.05-1 %) y B) acetonitrilo con 0.05 -1 % de TFA. Se trabaja en gradiente y con un flujo de 1 – 4 mL/min. Normalmente se requieren varias etapas de separación para lograr aislar los péptidos (Otte et al., 2007a) o para lograr una cantidad de péptido apreciable (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). Esta técnica es empleada como una etapa de fraccionamiento más fino, que separaría individualmente los péptidos para su posterior identificación.

Para secuenciar los péptidos se suele emplear un equipo de cromatografía líquida en fase reversa al que se le acopla un espectrómetro de masas en tándem. Usualmente se emplean espectrómetros con fuentes de ionización como ESI (ionización por electrospray) y MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz). El espectro de masas se analiza para determinar la masa experimental del péptido mientras que el espectro de MSn se procesa con el fin de llevar a cabo la secuenciación y calcular la masa teórica (Ruiz-Giménez et al., 2012 ; Otte et al., 2007b). La identificación del péptido se puede realizar mediante la búsqueda de las masas obtenidas en bases de datos como NCBI y usando software online como Mascot (Pan y Guo, 2010). Otro método empleado para la secuenciación de péptidos consiste en aplicar repetidamente la reacción de Edman a un péptido aislado. Mediante esta reacción se van extrayendo uno a uno los aminoácidos desde el extremo N-terminal, de forma que se obtiene la secuencia completa. Hoy en día este proceso puede realizarse automáticamente mediante secuenciadores automáticos (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Otte et al., 2007a).

Una vez que el péptido ha sido identificado, es posible sintetizarlo químicamente de forma que se puede comprobar su efecto inhibitor tanto *in vitro* como *in vivo* (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Ruiz-Giménez et al., 2012).

2.3.3. Relación estructura-actividad

La gran mayoría de péptidos actúan como inhibidores competitivos (Li et al., 2004). El mecanismo concreto por el que estos péptidos inhiben a ACE aún no ha sido clarificado, debido a la gran variedad de péptidos generados durante la hidrólisis de proteínas alimentarias. Cushman y Ondetti (1982) propusieron un modelo para la interacción entre sustrato o inhibidores competitivos y el centro activo de ACE basada en la presumible analogía de ACE con la zinc-metalopeptidasa carboxipeptidasa A, modelo que sirvió como base para el diseño de potentes inhibidores.

En el modelo (Figura 2.3), se describen 3 zonas, denominadas S1, S1' y S2', que pueden interactuar con los correspondientes radicales de los aminoácidos de sustratos o inhibidores. El ión zinc de ACE se localiza aproximadamente entre la zona S1 y S1' participando en la rotura hidrolítica del enlace peptídico que une el antepenúltimo y el penúltimo aminoácido del sustrato, liberando como producto un dipéptido. Un grupo donador de puente de hidrógeno situado entre le zona S1' y S2', podría enlazar con el último enlace peptídico del sustrato. Por último, un grupo cargado positivamente en el centro activo de ACE establece interacciones iónicas con el grupo carboxilo cargado negativamente del C-terminal del sustrato. Los estudios llevados a cabo por los autores del modelo con sustratos y con varias clases de inhibidores competitivos pusieron de manifiesto que S1, S1' y S2' son zonas más o menos hidrofóbicas.

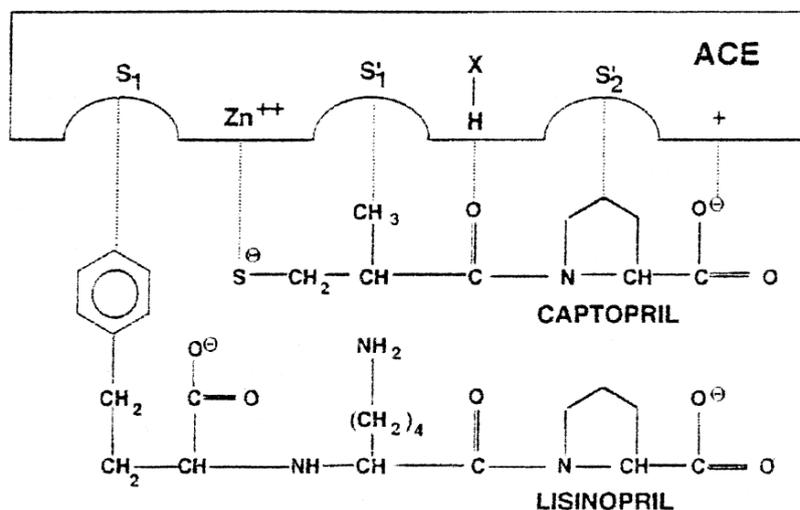


Figura 2.3. Esquema de interacción enzima – inhibidor para la enzima convertidora de la angiotensina (Li et al., 2004).

Éste es un modelo adecuado para inhibidores como captopril, sin embargo, el mecanismo preciso de inhibición de ACE de los péptidos derivados de alimentos no está bien descrito. No obstante, a partir de los datos experimentales, se han encontrado algunos rasgos comunes para los péptidos que poseen un buen poder inhibidor. Según las revisiones de Li et al. (2004), López-Fandiño et al. (2006) y Hong et al. (2008), las principales generalidades son:

- Los péptidos inhibidores suelen contener de 2 a 12 aminoácidos, aunque se han determinado péptidos activos de más de 27.
- La relación entre estructura y actividad para los diferentes péptidos inhibidores indica que el enlace con ACE está fuertemente influenciado por la secuencia de tripéptidos

- del C-terminal del sustrato. Esta secuencia puede interactuar con los sitios S1, S1' y S2' del centro activo de ACE, según el modelo propuesto anteriormente.
- c) La enzima parece tener preferencia por sustrato o inhibidores que tienen aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o cadenas ramificadas) en una de las 3 posiciones terminales del C-terminal. Muchos estudios han mostrado que dipéptidos o tripéptidos con alta actividad inhibidora tienen triptofano, fenilalanina, tirosina o prolina en su C-terminal y aminoácido alifático ramificado en el N-terminal. Si un péptido tiene propiedades hidrofílicas, normalmente tendrá una actividad baja o nula, ya que esto le hace imposible que acceda al centro activo de la enzima. Por ejemplo, ACE muestra poca afinidad por sustrato o inhibidores competitivos con aminoácidos dicarboxílicos terminales tales como Ácido glutámico.
 - d) Los datos de estructura-actividad sugieren también que la carga positiva de lisina o arginina en C-terminal, contribuyen sustancialmente a la potencia inhibidora.
 - e) La intensidad de la actividad inhibidora se ve afectada por el aminoácido adyacente a la prolina, cuando ésta se sitúa en el C-terminal. Para una buena actividad inhibidora, el aminoácido debe ser hidrofóbico.
 - f) ACE también muestra alta estereoespecificidad hacia radicales de aminoácidos en la posición 3 del C-terminal. Es un requisito absoluto para este radical tener una configuración L. Por el contrario, ACE muestra una menor estereoespecificidad en posición 4.

Como complemento a los estudios experimentales, se han desarrollado estudios con métodos computacionales para establecer una relación cuantitativa entre la estructura de los péptidos y su actividad inhibidora. Pripp et al. (2004), determinaron estas relaciones en péptidos de proteínas de leche y establecieron relación entre algunas propiedades como hidrofobicidad o carga positiva en el C-terminal con la actividad inhibidora de péptidos mayores de 6 aminoácidos. Sin embargo, no encontraron relación entre la estructura del N-terminal y la actividad inhibidora.

Por otra parte, algunos estudios apuntan que en el mecanismo de inhibición de ACE por parte de éstos péptidos se pueden ver implicadas otras zonas activas o sub-sitios de la enzima distintas al centro activo. En el artículo de Pina y Roque (2009) se obtuvieron las interacciones más probables entre distintos péptidos y ACE mediante métodos computacionales. Para uno de los péptidos estudiados, el de menor potencial, las interacciones se producían fuera del centro activo.

La mayoría de estudios previos sobre la correlación estructura-actividad en péptidos inhibidores de ACE se basaban solamente en el análisis de la secuencia de aminoácidos. Por ello, los estudios con métodos computacionales para establecer relaciones cuantitativas estructura-actividad de los péptidos inhibidores de ACE, se presentan como una herramienta muy útil para determinar los elementos estructurales de los péptidos que son críticos en la interacción con los centros activos de ACE, así como dilucidar el mecanismo de inhibición de estos péptidos (Yin et al., 2010).

2.3.4. Biodisponibilidad

Los péptidos antihipertensivos derivados de alimentos son compuestos naturales y más seguros para los pacientes que los medicamentos tradicionales (Takano, 2002; Riordan, 2003; Cadée et al., 2007; He et al., 2008; Ishida et al., 2011). Pero para que un péptido sea efectivo contra la hipertensión no basta con ser buen inhibidor de ACE necesita, además, llegar activo a los órganos diana. De hecho, el potencial inhibidor de ACE de estos péptidos no siempre está relacionado con su efecto antihipertensivo. Se conocen algunos péptidos con gran potencial inhibidor de ACE *in vitro* que no muestran actividad al administrarse vía oral o intravenosa. Por ejemplo, YGGY ($IC_{50}= 16.2 \mu M$) un potente inhibidor aislado del sake, no tiene efecto hipotensivo cuando se administra oralmente incluso en dosis de 100 mg/kg (Saito et al., 1994). Otro ejemplo aún más drástico es el péptido LRIPVA que presentaba un valor IC_{50} de 0.5 μM en ensayos *in vitro*, pero no presentó efecto antihipertensivo *in vivo* aún en alta dosis (100 mg/kg) (Yang et al., 2003) Similares resultados han sido descritos por otros investigadores (Fujita et al., 2000).

Los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos dependen de su habilidad para permanecer intactos hasta alcanzar sus objetivos, lo que implica resistir la hidrólisis de enzimas digestivas y la absorción a través del epitelio intestinal hasta alcanzar el sistema cardiovascular. A continuación se detallan las etapas que pueden alterar la biodisponibilidad de los péptidos inhibidores de ACE y los estudios realizados sobre el efecto de estos péptidos *in vivo*.

2.3.4.1. Etapas implicadas en la biodisponibilidad de los péptidos

Para su estudio se suelen emplear métodos *in vitro*, como digestiones simuladas o estudios de absorción con células Caco-2.

A) DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL

Las investigaciones sobre digestión gastrointestinal de proteínas de leche o fragmentos de proteínas y la resistencia a la digestión de secuencias con capacidad inhibidora conocida han sido probadas en diversos estudios *in-vitro*, en los que se reproducía el proceso gastrointestinal mediante una hidrólisis secuencial con pepsina y enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas).

En muchas ocasiones los péptidos no resisten la digestión y son degradados por las enzimas digestivas. El estudio de Tavares et al., (2011) muestra algunos de los posibles efectos de la digestión sobre los péptidos activos. En él, se estudiaron 11 péptidos inhibidores de ACE (entre 6 y 11 aminoácidos) identificados en un hidrolizado de concentrado de proteínas de lactosuero. Ninguno de los péptidos resistió la digestión simulada a la que fueron sometidos. Alguno de ellos como DKVGINYW con un IC_{50} de 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue hidrolizado en péptidos más pequeños como NY; DKVGIN; DKVGI, la capacidad inhibidora *in vitro* (IC_{50}) empeoró hasta 254.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Otros péptidos como DAQSAPLRVY o KGYGGVSLPEW fueron degradados, pero la hidrólisis no provocó un empeoramiento considerable de su actividad inhibidora *in vitro*. Es decir, los péptidos originados a partir del péptido inhibidor inicial seguían siendo activos *in vitro*. Otros estudios apuntan a que, en algunas ocasiones, el efecto inhibidor de los péptidos degradados podría mantenerse también *in vivo* (Miguel et al., 2006).

Otro de los posibles efectos que se pueden encontrar es que el péptido con actividad inhibidora de ACE *in vitro* pierda totalmente sus propiedades inhibidoras al ser atacado por las enzimas gastrointestinales. Aunque el caso contrario también ha sido descrito, es decir, péptidos que inicialmente no presentan actividad *in vitro* son degradados dando lugar a péptidos con mejor actividad inhibidora *in vitro* e *in vivo* (Maneno et al., 1996; Manso y López-Fandiño, 2003). En otros estudios sin embargo, se identificaron péptidos capaces de soportar la digestión gastrointestinal sin sufrir ninguna alteración, es el caso de LHLPLP ($IC_{50} = 4 \mu\text{g}/\text{mL}$) obtenido a partir de la fermentación de caseínas (Quirós et al., 2009).

Todos estos estudios apuntan a que la digestión gastrointestinal es un factor esencial en la determinación de la actividad antihipertensiva de los inhibidores de ACE. Puesto que hay péptidos que pierden o reducen considerablemente su capacidad inhibidora al ser administrado oralmente mientras que otros péptidos que mostraban actividad inhibidora baja o nula, se convierten en buenos inhibidores de ACE al ser hidrolizados por las enzimas gastrointestinales. Los péptidos inhibidores con el aminoácido Prolina, especialmente en C-terminal, son generalmente más resistentes a la degradación mediante enzimas digestivas. Los tripeptidos que contienen en C-terminal Prolina-Prolina se describen como resistentes a las

peptidasas específicas de prolina (FitzGerald y Meisel, 2000). Por tanto, se postula que la administración oral de di y tripéptidos con potencial inhibidor *in vitro*, que contienen radical Prolina, deben ser absorbidos en su forma primitiva desde el tracto intestinal a la circulación sanguínea y pueden ejercer actividad antihipertensiva. Esta afirmación está sustancialmente confirmada por muchos estudios en los que la simple administración oral de estos péptidos, especialmente di-tripéptidos, origina una actividad hipotensiva incluso a bajas dosis (Li et al., 2004).

B) ABSORCIÓN INTESTINAL

El transporte de péptidos intactos desde el intestino a la sangre es un fenómeno en estudio que tienen gran relevancia para el conocimiento de la biodisponibilidad de los péptidos activos. Los estudios de absorción celular se hacen con Caco-2, una línea de células procedentes de un carcinoma de colon rectal humano que presentan actividades enzimáticas y mecanismos de transporte similares a los del epitelio del intestino delgado. Aunque hay que tener en cuenta que los resultados de permeabilidad registrados mediante estos ensayos siempre son menores que los que se obtendrían *in vivo*.

Generalmente los péptidos presentes en el intestino son introducidos dentro de los enterocitos (células epiteliales del intestino) mediante transportadores de péptidos (PepT1). Una vez dentro suelen ser hidrolizados en aminoácidos por diversas peptidasas y posteriormente son expulsados a través de la membrana basolateral al torrente sanguíneo (Vermeirssen et al., 2004). Sin embargo, recientes investigaciones ponen de manifiesto que el transporte de inhibidores de ACE podría diferir de la habitual digestión y absorción de alimentos. Los péptidos pueden atravesar la membrana mediante transporte paracelular, mediante el cual los péptidos hidrosolubles podrían pasar a través del espacio intercelular. Este mecanismo ha sido propuesto para péptidos como VPP, IPP o VLPVP (Satake et al., 2002; Folz et al., 2008; Lei et al., 2008). Por otro lado los péptidos liposolubles podrían tener un mecanismo de transporte transcelular mediante difusión (Knütter et al., 2008). El péptido ALPMHIR es capaz de atravesar las membranas de Caco-2 intacto, aunque en bajas concentraciones (Vermeirssen et al., 2002). El estudio llevado a cabo por Knütter et al. (2008) pone de manifiesto que los transportadores de péptidos (PepT1 y PepT2) no controlan la absorción intestinal ni la reabsorción renal de varios inhibidores de ACE estudiados.

En ocasiones son las peptidasas de la membrana de los enterocitos las responsables de hidrolizar los péptidos. Por ejemplo el péptido VY genera efecto antihipertensivo *in vivo* cuando se suministra en altas dosis. Sin embargo presenta ratios muy bajos de absorción en

células Caco-2, por lo que se deduce que sólo cuando las peptidasas están saturadas se produce el paso del péptido (Matsui et al., 2002). De esta forma, pequeños péptidos podrían pasar a la sangre evitando su digestión total en aminoácidos. Este mecanismo, junto con los indicados anteriormente permiten a los péptidos llegar intactos al torrente sanguíneo.

C) ESTABILIDAD EN SANGRE

Otro aspecto a tener en cuenta es la estabilidad de los péptidos en la sangre. Los péptidos deben ser resistentes a las enzimas que se encuentran en ella. Entre estas enzimas está la propia ACE, que podría hidrolizar a los péptidos inhibidores (Vermeirssen et al., 2004)

Teniendo en cuenta la posibilidad de que los péptidos inhibidores puedan ser hidrolizados por diversas enzimas del organismo, se puede usar la clasificación propuesta por Fujita et al. (2000) basada en la resistencia de péptidos a la hidrólisis de ACE y hacerla extensiva al resto de enzimas del organismo que pueden alterar los péptidos activos. De esta forma podemos encontrar 3 tipos de péptidos inhibidores de ACE:

- a) Tipo inhibidor: no son modificados por las enzimas del organismo.
- b) Tipo sustrato: péptidos que son hidrolizados por ACE o por enzimas gastrointestinales dando como resultado péptidos con menor poder inhibidor.
- c) Tipo pro-inhibidor: péptido que al ser hidrolizado por las enzimas se convierten en verdaderos inhibidores de ACE.

Los grupos primero y tercero presentan actividades antihipertensivas después de su administración oral. Además se podría decir que la potencia de inhibición de los péptidos disminuye cuando aumenta la longitud de su cadena peptídica (Roberts et al., 1999).

2.3.4.2. Estudios *in vivo*

Las digestiones gastrointestinales o los modelos de membranas Caco-2 presentan modelos válidos para el estudio de las diferentes etapas que pueden alterar a los péptidos activos durante la digestión. Pero los estudios *in vivo* suponen un acercamiento mucho más real al proceso de digestión-absorción-acción de estos péptidos.

Por un lado se encuentran los estudios con animales, generalmente realizados con ratas espontáneamente hipertensas (SHR), que revelan la capacidad de los péptidos liberados durante la hidrólisis (o fermentación) de proteínas para mejorar la evolución de la hipertensión y en general, reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Hay numerosos estudios que emplean SHR para comprobar el efecto *in vivo* de péptidos inhibidores de ACE. Un ejemplo podría ser el estudio realizado por Sánchez et al., (2011), en el que se suministró una dosis diaria de 800 mg/kg de un hidrolizado de caseínas bovinas a ratas SHR durante 6 semanas. La presión sanguínea aumentó 33 mmHg en el grupo control mientras que en el grupo tratado con el hidrolizado el aumento fue sólo de 18 mmHg. Además se encontraron mejoras en otros indicadores (reducción del desarrollo de hipertrofia cardiaca y vascular, reducción de fibrosis intersticial entre otros) que los hacen adecuados para el tratamiento de la hipertensión. Similares resultados fueron obtenidos para los hidrolizados de gambas obtenidos mediante un proceso a escala planta piloto (He et al., 2008).

Estudios como los anteriores, realizados con leches fermentadas confirman el efecto beneficioso de los péptidos liberados. Es destacable que el consumo de leche desnatada por sí sola no produjo ningún efecto beneficioso (Sipola et al., 2002), por tanto, la digestión gastrointestinal no parece suficiente para generar los péptidos activos. Dentro de las leches fermentadas cobra especial interés la presencia de dos tripéptidos: IPP y VPP, generalmente producidos mediante la fermentación con *Lactobacillus helveticus*. Numerosos estudios han demostrado la capacidad de estos productos de reducir la presión sanguínea *in vivo* (Nakamura et al., 1995; Masuda et al., 1996)

También se han comprobado el efecto de muchos péptidos aislados, como KVLVPVQ, obtenido de la hidrólisis enzimática de β -caseína bovina con la proteasa de *Lactobacillus helveticus* CP790 que, presenta un efecto antihipertensivo dosis dependiente. (Maeno et al., 1996). Y más recientemente: LAP (Ming et al., 2011) o IQP (Lu et al., 2010). Además, cuando se suministra los hidrolizados o péptidos inhibidores a ratas que no presentan hipertensión (Wistar Kyoto, WKY) no se observaron efectos adversos.

Más interesante aún resulta el estudio de los efectos que tienen los péptidos inhibidores de ACE derivados de alimentos sobre humanos. Sólo algunos de todos los péptidos identificados como inhibidores de ACE *in vitro*, han sido probados en estudios humanos (Saito, 2008; FitzGerald et al., 2004). En muchos de los ensayos con humanos se ha observado un descenso en la presión sanguínea después de la ingesta de hidrolizados de proteínas de leche o de productos lácteos fermentados.

Un buen número de los estudios de antihipertensividad de péptidos en humanos se han llevado a cabo con leches fermentadas, principalmente por *Lactobacillus helveticus* (Hata et al., 1996; Seppo et al., 2003; Mizushima et al., 2004; Tuomilehto et al., 2004; Jauhiainen et al., 2005). Estas leches fermentadas contienen IPP y VPP, dos potentes péptidos inhibidores de

ACE. Todos estos estudios ponen de manifiesto la disminución de la presión sanguínea en individuos hipertensos después de un tratamiento de 8-21 semanas. Las reducciones de tensión sistólica y diastólica obtenidas están comprendidas entre 4.1-11 mmHg y 1.8-6,9 mmHg, respectivamente. Además, IPP y VPP han demostrado también ser efectivos al suministrarse en forma de pastillas (Aihara et al., 2005), con la ventaja de no presentar efectos adversos incluso en altas dosis (Ishida et al., 2011). Sin embargo, otros autores (Hirota et al., 2007) encontraron que al administrar hidrolizados que contenían estos dos péptidos activos no se producía un cambio en la presión sanguínea. Si bien, sí se observó una mejora en la disfunción vascular endotelial, que podría prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Otros hidrolizados, en este caso de proteínas séricas (Fluegel et al., 2010), redujeron la tensión arterial sistólica y diastólica en 8.0 y 8.6 mmHg, respectivamente, en adultos que tenían previamente elevados valores de las mismas. Sin embargo, individuos con valores de presión sanguínea normales no sufrieron ninguna variación. De la misma forma, los hidrolizados de caseínas también muestran este efecto reductor de la presión sanguínea (Sano et al., 2005; Cadée et al., 2007).

Por tanto, teniendo en cuenta la ausencia de efectos negativos y que se ha demostrado que una reducción de tan sólo 5 mmHg en la presión sanguínea reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en un 16 % (FitzGerald et al., 2004), estos péptidos inhibidores de ACE pueden emplearse para el tratamiento o prevención de la hipertensión.

2.4. TRATAMIENTO DE HIDROLIZADOS

Los péptidos inhibidores generados durante el proceso de hidrólisis o fermentación pueden ser comercializados sin modificaciones posteriores. Es decir, el producto del proceso de fermentación o hidrólisis es el producto final que se comercializa. En él los péptidos bioactivos estarán en una concentración que depende del tratamiento al que se ha sometido la materia prima de partida así como de su concentración proteica inicial. Los productos así comercializados suelen ser productos fermentados como Calpis (Nakagama et al., 1989) o Evolus (Tossavainen et al., 2005) mientras que los hidrolizados se suelen someter a tratamientos posteriores.

El objetivo principal de estos tratamientos es concentrar el producto en péptidos activos dando lugar a un nuevo producto con alto contenido en péptidos activos que puede ser

empleado en la formulación de alimentos funcionales. Para concentrar los péptidos de interés se recurre a procesos de filtración y/o secado.

2.4.1. Purificación

En la mayoría de artículos publicados, los autores proponen un proceso de producción a pequeña escala, en el que una vez liberados mediante hidrólisis o fermentación los péptidos son fraccionados mediante membranas y posteriormente aislados mediante procedimientos cromatográficos con el fin de identificarlos (Otte et al., 2007a; Tavares et al., 2011). Desde un punto de vista comercial no parece adecuado tratar de aislar estos péptidos. Ya que no estamos hablando del principio activo de un medicamento, que justificaría el alto coste del proceso cromatográfico, sino de nutracéuticos que serán empleados en fórmulas alimentarias. Por tanto, la purificación y/o concentración con membranas parece una opción más adecuada.

Se han desarrollado algunas patentes para la producción de péptidos antihipertensivos. Algunos autores proponen filtraciones convencionales (Wu et al., 2009). Pero en general, se recurre a la filtración tangencial. Al contrario que en la filtración convencional con esta forma de operar el flujo de alimentación es tangencial a la superficie de la membrana. La separación se produce debido a una fuerza impulsora: gradiente de concentración, presión parcial, potencial eléctrico o presión.

En este proceso de filtración la corriente de entrada se divide en dos (corriente de retenido y de filtrado). La corriente de retenido estaría enriquecida en los componentes que presentan mayor dificultad en atravesar la membrana mientras que en el filtrado se encontrarían los componentes cuyo paso a través de la membrana es más favorable.

Durante la operación de filtración debido al paso de solutos a través de la membrana se produce un ensuciamiento ocasionado por depósitos de precipitados, partículas, proteínas, sales, etc. Esta colmatación o fouling genera una resistencia al flujo. Para eliminar esta resistencia es necesaria una limpieza profunda para conseguir recuperar la membrana.

Entre las separaciones con membranas destacan las filtraciones en las que la fuerza impulsora es la presión. Para la purificación y concentración de péptidos esta es también la forma de operar más común. De acuerdo al tamaño de partículas que son capaces de separar podemos identificar 4 tipos de filtraciones:

- **Microfiltración:** Se usa para partículas grandes (0.05 – 10 μm). No tiene aplicación en la purificación de péptidos bioactivos.

- Ultrafiltración: Se usa para retener moléculas de tamaño medio-grande (2 – 100 nm). El tamaño de poro suele oscilar entre 0.001 y 0.1 μm aunque se suelen describir por su tamaño de corte (1-100 kDa). Las presiones empleadas suelen estar comprendidas entre 1 y 10 bar.
- Nanofiltración: Se emplea para retener moléculas de bajo peso molecular (200 -1000 Da) e iones multivalentes como el calcio. Los tamaños de poro están comprendidos entre 0.005 y 0.0005 μm y las presiones aplicadas van desde 3 a 20 bares.
- Ósmosis inversa: con esta técnica se retienen moléculas de muy bajo peso molecular como sales. El tamaño de poro es inferior a 0.0005 μm y aplicando presiones entre 10 y 50 bares.

Uno de los primeros materiales usados en estas membranas fue el acetato de celulosa. Es barato y fácil de obtener pero presenta muy poca resistencia al cloro, pH extremos y a la temperatura por lo que no soporta limpiezas severas. Un material mucho más estable es la poliamida, usada en osmosis inversa y nanofiltración, el problema es que se colmata fácilmente y no es resistente al cloro. Las polisulfonas y polietersulfonas presentan buena estabilidad química y térmica, sin embargo son atacados por agentes oxidantes. La mayoría de membranas usadas en la obtención de péptidos bioactivos son de materiales poliméricos (Jiang et al., 2010; Tolton et al., 2003).

La separación por membranas inorgánicas no ha sido tan utilizada en la obtención de péptidos bioactivos (Lin et al., 2011). Este tipo de membranas presentan ventajas frente a las membranas poliméricas (Cheryan, 1998), entre las que destacan:

- Muy buena resistencia química. Muy pocos productos químicos pueden degradarlas.
- Alta resistencia a la degradación por abrasión.
- Rango de pH en el que se puede operar es muy amplio (0.5 a 13)
- Estabilidad térmica, soportan hasta 300 $^{\circ}\text{C}$
- Soportan altas presiones de trabajo, aunque normalmente se limitan a 150 bar debido a menor resistencia de los materiales sobre los que van montadas.
- Vida útil mayor que las membranas orgánicas, soportando limpiezas frecuentes

Entre los inconvenientes que presentan estas membranas podríamos señalar:

- Son quebradizas, siendo sensibles a las vibraciones.
- Tienen una menor variedad de tamaños de corte

- Requieren mayor capacidad de bombeo para trabajar a velocidades recomendadas (2-6 m/s)
- Precio elevado

Entre las membranas inorgánicas podemos encontrar membranas de material cerámico, vidrio o acero. En la fabricación de las primeras se han utilizado numerosos materiales cerámicos. Dos de los más destacados son las membranas constituidas por un soporte poroso de carbono y una capa activa de óxido de zirconio o la formada por una base de α -alúmina y una capa activa de γ -alúmina.

Como se indicó anteriormente, los péptidos inhibidores de ACE suelen tener un tamaño comprendido entre 2 -12 aminoácidos, lo que supone un tamaño molecular inferior a 3 kDa. La mayoría de estudios emplean filtros de celulosa o poli-etersulfona de 10, 5, 3 kDa para el fraccionamiento de los hidrolizados.

En algunos procesos de producción propuestos, el tamaño de corte es inferior (nanofiltración), en estos casos, se necesita una presión muy alta para el proceso (30 bar) (Tossavainen et al., 2005).

Dependiendo del tamaño de corte de la membrana empleada y de tamaño de los péptidos inhibidores, éstos pueden ser recogidos tanto en el filtrado como en el retenido. En el caso de ser recogidos en el filtrado se les suele someter a una etapa posterior de concentración por secado. Si son recogidos en el retenido, su concentración aumentará considerablemente. Para evitar la concentración excesiva de sales, se podría re-disolver el retenido con agua y volver a filtrar para así reducir la concentración de sales hasta el nivel deseado (Tossavainen et al., 2005). Otros autores proponen el empleo de la electrodiálisis en conjunto con ultrafiltración o nanofiltración (Tolton et al., 2003)

Si en lugar de concentrar los péptidos en el retenido, lo que se pretende es pasar los péptidos activos de pequeño tamaño al filtrado, se podría operar mediante diafiltración. De esta manera se obliga a que la mayoría de péptidos pequeños pasan a través de las membranas (Tolton et al., 2003). Posteriormente el permeado puede ser concentrarlo por osmosis inversa.

2.4.2. Estabilización: secado por atomización

Una de las formas de conservar alimentos es reducir su contenido de humedad por debajo del 13 %, con el fin de reducir la actividad de agua y así evitar la proliferación de microorganismos. Además de facilitar y reducir los costes de transporte y almacenamiento.

La liofilización es el proceso por el que se elimina el agua de un alimento mediante sublimación. El proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas y a alto vacío, lo que permite secar el producto sin que el agua pase a estado líquido. De esta forma se generan productos de gran calidad, que no sufren prácticamente ninguna alteración. Sin embargo, los costes son altos y aumentan considerablemente cuando la cantidad del producto a secar es elevada, ya que se necesita refrigeración, vacío y largos tiempos de operación (Filková et al., 2006). El secado por atomización por el contrario presenta menores costes de operación. En este secado la velocidad de evaporación del agua es alta y el tiempo que el producto permanece a alta temperatura es breve, lo que permite obtener productos de gran calidad. Sin embargo, es necesario comprobar la estabilidad del producto ya que en algunos casos se podrían producir alteraciones no deseadas.

El secado por atomización es una de los métodos más comunes en la industria para secar alimentos líquidos. En la Figura 2.4 se muestra un esquema muy simplificado del proceso.

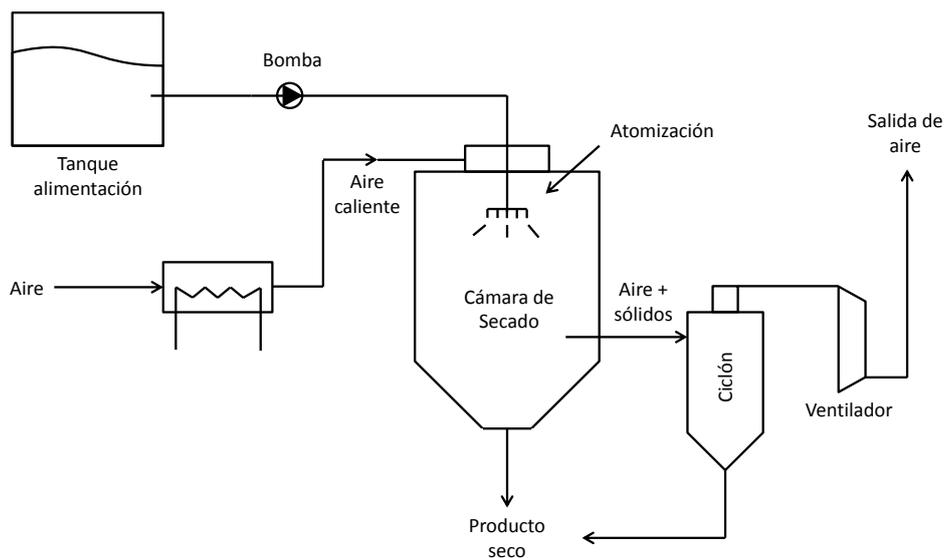


Figura 2.4. Esquema general de secadero por atomización.

La alimentación es introducida por la parte superior donde se convierte en spray mediante un dispositivo conocido como atomizador. El tamaño de las gotas suele estar comprendido entre 10-200 μm . Estas pequeñas gotas se ponen en contacto con aire caliente en la cámara de secado. Debido al pequeño tamaño de las gotas, el área superficial es muy grande, lo que facilita la evaporación de la humedad. Por tanto, el tiempo de evaporación es rápido, normalmente entre 1-20 s. Además, la mayor parte del secado se produce bajo condiciones constantes debido al calor latente necesario para evaporar el agua (Brenan, 2006). No obstante, reduciendo el tiempo de permanencia de las partículas en la cámara de secado se

reduce el daño por calentamiento del producto. El producto se recoge en la parte inferior de la cámara de secado. El propio aire de secado arrastra a cierta cantidad de partículas que son recuperadas por uno o varios ciclones dejando el aire limpio.

El aire empleado en el secado puede ser calentado mediante un intercambiador de calor, que use vapor a presión o aceite como fluido calefactor. El calentamiento del aire se puede conseguir también mediante resistencias eléctricas, si bien este sistema suele emplearse para secaderos de pequeño tamaño como los de plantas piloto.

Hay 3 tipos de atomizadores (Brenan, 2006; Maupoei et al., 2001):

- Rodete centrífugo, es un disco o rueda situado al final del conducto de alimentación que gira a 5000-20000 r.p.m. La alimentación se produce cerca del centro de rotación del disco y la fuerza centrífuga de éste empuja al fluido hacia el borde del disco y lo expulsa al exterior. Inicialmente se forman hilos que se rompen y dan lugar a gotas. Estos atomizadores son apropiados para fluidos viscosos y son resistentes a la posible abrasión o bloqueo que pueden producir partículas sólidas en la alimentación.
- Tobera de presión consisten en un pequeño orificio, con diámetros entre 0.4-4 mm, a través del cual se introduce la alimentación a alta presión (5-50 MPa). Un pequeño tubo en el interior de la boquilla genera un movimiento en espiral del líquido, de forma que al salir por el orificio genera un spray en forma de cono. Las gotas producidas son homogéneas siempre que la bomba suministre una presión constante. Se recomienda su uso para soluciones homogéneas de baja viscosidad, ya que el riesgo de bloqueo o abrasión por partículas sólidas es alto.
- Toberas neumáticas. Cuenta con una apertura anular a través de la que sale el gas (normalmente aire) a gran velocidad. La alimentación sale por un orificio concéntrico al de la salida de aire. Se crea un efecto Venturi que hace que el líquido alimentado se convierta en spray. En este caso, la bomba de alimentación no necesita suministrar el fluido a alta presión ya que es el gas el que sale presurizado. Esta boquilla también es susceptible al bloqueo y abrasión. Además, el tamaño de las gotas formadas no suele ser tan homogéneo como el obtenido con los otros dos atomizadores.

En este tipo de secado existen 3 formas básicas de operar (Filková et al., 2006; Brenan, 2006), un esquema básico de cada una es representado en la Figura 2.5.

- a) Flujo paralelo. Tanto la alimentación como el aire caliente se introducen por la parte superior de la cámara de secado y circulan paralelamente hacia abajo. Las

temperaturas más altas se encuentran en la parte superior del secadero. En esa zona el producto está en forma de gotas, lo que hace que no sufra un calentamiento severo debido a la evaporación. El aire se va enfriando al evaporar el agua y las partículas secas estarán rodeadas de aire más frío. Este sistema es adecuado para secar compuestos que se puedan alterar por altas temperaturas. Las cámaras de secado que operan de esta forma son torres cilíndricas de base cónica a las que se le introduce el aire verticalmente. Este diseño es apropiado para secar gotas de gran tamaño de compuestos sensibles al calor o que tienden a quedarse adheridas en la pared de la cámara. La pared de la cámara puede ser refrigerada para facilitar la recogida del polvo. Otra posibilidad es introducir el aire tangencialmente, lo que permite reducir la altura de la cámara de secado. El aire describe espirales y arrastra a las partículas, que tienden a chocar contra las paredes de la cámara. Este tipo de cámara es adecuado para productos no demasiado sensibles al calor y que forman partículas que no se quedan pegadas a la pared.

- b) Flujo contracorriente. El aire de secado entra por la parte inferior mientras que la alimentación se atomiza en la parte superior. En este caso las partículas secas estarán en contacto con el aire que entra, por tanto, la temperatura de salida del producto seco será tan alta como la del aire de entrada. Evidentemente, este modo de operar no es adecuado para productos termolábiles.
- c) Flujo mixto. La boquilla de alimentación se coloca en la parte inferior de la cámara proyectando la alimentación atomizada hacia arriba. En aire caliente se introduce en parte superior. Las partículas presentan un movimiento en contracorriente al comienzo para luego caer y circular en paralelo con el aire. Esta forma de operar se recomienda para cámaras de secado pequeñas, ya que el tiempo de residencia de las partículas en la misma es elevado. No se suele emplear en industria alimentaria.

Los productos ricos en grasa o azúcares tienden a adherirse a la pared de la cámara, para recuperar estos depósitos en la industria se emplean distintos sistemas como pueden ser martillos que golpean la pared externa de la cámara, cepillos o cadenas que barren la superficie interna. Además la temperatura de la cámara puede ser reducida insuflando aire frío en el exterior de la misma o circulando agua fría por medio de una camisa de refrigeración, el descenso de la temperatura de la cámara evita la adhesión de partículas.

El aire que sale de la cámara de secado arrastra partículas finas que deben ser recuperadas debido a su valor económico así como por el posible daño medioambiental que pudieran originar. Esta separación se lleva a cabo generalmente en ciclones. Aunque no son tan usados

en industrias alimentarias, también se podrían usar filtros industriales para retener las partículas o scrubbers que lavan la corriente de salida de aire con la corriente líquida de la alimentación.

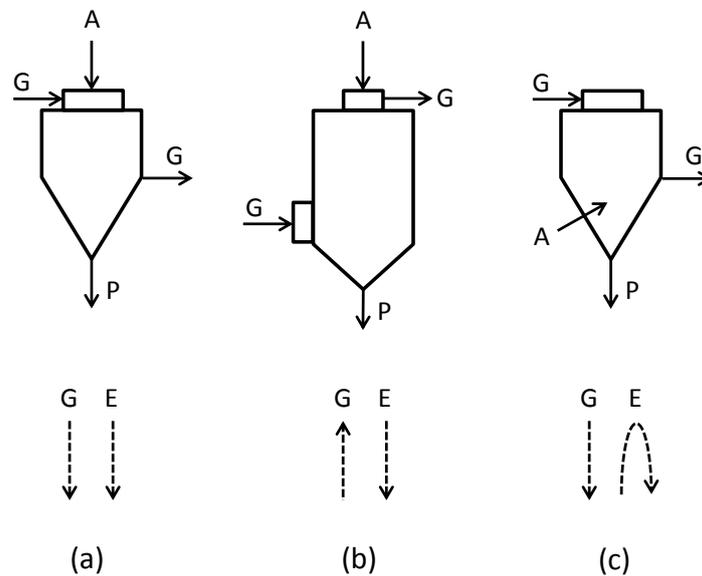


Figura 2.5. Esquema de dispositivo para secado en paralelo (a), en contracorriente (b) y en flujo mixto (c). A: alimentación; G: gas de secado; P: producto; E: producto atomizado (Filková et al., 2006).

En el caso de la producción de péptidos inhibidores de ACE derivados de alimentos, en la mayoría de los artículos científicos existentes no se estudia el método de secado. Por otra parte, las patentes se limitan a nombrar el mecanismo por el que recomiendan secar el producto sin detallar el proceso (Tolton et al., 2003; Schlothauer et al., 2006). Entre los secados que se emplean en estas patentes se pueden enumerar: el secado a vacío, evaporación, liofilización y secado por atomización.

Algunos autores advierten de que tanto un tratamiento mecánico o térmico severo, puede afectar negativamente a la actividad de los hidrolizados (Hernández-Ledesma et al., 2011). Sin embargo algunos autores comprobaron que la actividad no parecía verse afectada en el secado por atomización en (Tolton et al., 2003; He et al., 2008; Lin et al., 2011). Algunas patentes proponen el secado por atomización para la estabilización de los péptidos, pero no detallan las condiciones de operación (Cedee y Mallee, 2010)

3. Objetivos de la investigación

Con los antecedentes descritos anteriormente, se hace patente el interés científico de la hidrólisis enzimática de las proteínas de leche de cabra para la obtención de péptidos inhibidores de ACE. Con el fin de estudiar en detalle el proceso, se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudio de la hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche de cabra centrado en la producción de hidrolizados con alto potencial inhibidor ACE.
2. Puesta a punto de un proceso de filtración con membrana para la obtención de fracciones proteicas de la leche de cabra.
3. Estudio de la influencia del tratamiento enzimático sobre la actividad inhibidora de ACE de los hidrolizados de las fracciones proteicas.
4. Caracterización de los mejores hidrolizados obtenidos mediante la separación de fracciones activas por cromatografía de exclusión de tamaños e identificación de péptidos presentes mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
5. Estudio de la resistencia de los péptidos inhibidores de ACE a la digestión in vitro.
6. Estudio de la purificación de péptidos inhibidores de ACE mediante procesos de ultrafiltración con membranas cerámicas.
7. Estudio y optimización del proceso de estabilización por secado por atomización de los hidrolizados.

4. Materiales y métodos

4.1. MATERIALES

4.1.1. Sustrato

En esta investigación los sustratos empleados han sido las proteínas de leche de cabra UHT, cuya composición se detalla en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Composición de la leche de cabra.

Componente	Cantidad 100 g
Proteína	3.3 g
H. de Carbono	4.5 g
Grasa	1.6 g
Calcio	120 mg

El contenido en caseínas de la leche de cabra es ligeramente mayor que en otras especies. Además, β -caseína es la proteína mayoritaria en la leche de cabra (50 % del total de proteínas), lo que difiere considerablemente de la leche de vaca en la que tanto α -caseína como α S1-caseína son las más abundantes (37 % y 30 %, respectivamente) (Bernaka et al., 2011)

4.1.2. Enzimas

Las proteasas empleadas han sido las siguientes:

4.1.2.1. *Tripsina (EC 3.4.21.4)*

Proteasa de origen animal que se encuentra en el sistema digestivo de numerosos vertebrados. Su actividad catalítica se produce por la acción del residuo serina (serino-proteasa). Esta enzima ataca preferentemente en posiciones del carboxilo terminal de residuos de Arginina (R) y Lisina (K), ambos aminoácidos con grupos cargados positivamente. Además, como se indicó previamente, las enzimas específicas como tripsina generan hidrolizados con menor grado de amargor. El pH óptimo se encuentra entre 7-9 (Sipos y Merkel, 1970) y es estable en un rango de temperaturas de 30-60 °C (Guadix et al., 2000). La enzima utilizada en el estudio es comercializada por Novozymes (Dinamarca) como PTN 6.0S.

4.1.2.2. *Subtilisina (EC 3.4.21.62)*

Serino-proteasa de origen bacteriano originada por *Bacillus nichelliformis* y comercializada como Alcalase 2.4L (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Es una enzima de amplio espectro aunque ataca principalmente al carboxilo terminal de aminoácidos hidrofóbicos (Phelan y

Kerins, 2011). Es estable en un rango de pH entre 5 y 11.5 mostrando máxima actividad entre 50 y 60 °C.

4.2. OPERACIONES DE FILTRACIÓN

En el presente trabajo se han empleado procesos de filtración con dos objetivos distintos. Por un lado, la separación de las fracciones proteicas de la leche y por otro la purificación de péptidos inhibidores de ACE de un hidrolizado de caseínas. Ambos procesos tienen aspectos comunes que se detallan a continuación.

4.2.1. Membranas cerámicas

Aunque las membranas poliméricas han sido empleadas con frecuencia en la purificación de péptidos bioactivos, en este trabajo se emplearon membranas cerámicas que presentan ventajas frente a las primeras: mayor resistencia química tanto a pH extremos como a altas presiones, y mayor resistencia térmica, por lo que pueden ser esterilizadas con vapor y presentan una vida útil más larga (Shah et al., 2007). Se usaron membranas tubulares que permiten escalar el proceso con fiabilidad (Cui et al., 1997) y, para el caso de membranas cerámicas, requieren menos superficie que aquellas con configuraciones planas en idénticas condiciones (Grangeon y Lescoche, 2000)



Figura 4.1. Módulo y membranas de 1.2 m.

En concreto para este trabajo se han empleado membranas cerámicas tubulares modelo Inside Céram alojadas en módulo de acero inoxidable 316L (Figura 4.1). Los tamaños de corte

empleados fueron de 0.14 μm para obtención de las fracciones proteicas de la leche y de 50 kDa, 15 kDa y 3 kDa para el fraccionamiento del hidrolizado. Todas ellas suministradas por TAMI (Nyons, Francia) con las especificaciones técnicas que se indican en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Características técnicas de las membranas cerámicas empleadas.

Membrana	Nº Canales	Longitud (m)	Área de filtración (m^2)	Diámetro hidráulico (mm)
0.14 μm	3	1.2	0.045	3.6
50 kDa	3	0.25	0.0094	3.6
15 kDa	3	0.25	0.0094	3.6
3 kDa	1	0.25	0.0042	6

Estas membranas están constituidas por un soporte tubular de 10 mm de diámetro, formado por óxidos de aluminio, titanio y zirconio, mientras que el material de la capa activa es óxido de titanio. Este tipo de membranas pueden operar en condiciones extremas: 10 bar de presión, temperaturas de hasta 350 $^{\circ}\text{C}$ y pH en el rango 0-14.

La membranas se pueden caracterizar usando el modelo de resistencias en serie que describe el comportamiento observado en el caudal de filtrado en función de la presión de trabajo. Según este modelo (Cheryan, 1998) la ecuación que relaciona el flujo de filtrado con la presión es:

$$J_F = \frac{\Delta P}{R_M + R_F + R_P} \quad (4.1)$$

Donde J_F es el flujo de filtrado, ΔP es la presión transmembrana y R_M , R_F , R_P , son las resistencias de la membrana, de colmatación y de la capa de polarización, respectivamente.

Las membranas fueron caracterizadas mediante la determinación de su resistencia intrínseca, R_M , que se determinó utilizando agua pura como alimentación, ya que en este caso R_F y R_P serían nulas:

$$J_{F \text{ agua}} = \frac{\Delta P}{R_M} \quad (4.2)$$

La permeabilidad de la membrana, L , se define como la relación entre el flujo de filtrado y la presión transmembrana, es decir, es la inversa de R_M . Por tanto, la ecuación anterior podría expresarse de la siguiente manera:

$$J_{F \text{ agua}} = \frac{\Delta P}{R_M} = L \cdot \Delta P \quad (4.3)$$

En general, la permeabilidad de la membrana se determinó mediante una operación de calibrado. Este proceso consistió en pasar agua a través de la membrana a 50 °C y con una velocidad de 3.3 m/s, midiendo el flujo de filtrado a distintos valores de ΔP . La permeabilidad se determinó calculando la pendiente de la recta resultante al representar el flujo de filtrado frente a la ΔP , como indica la ecuación (4.3).

En los apartados siguientes se determinan las permeabilidades de las membranas vírgenes que servirán de referencia a lo largo del trabajo.

4.2.1.1. Membrana de 0.14 μm

En la Figura 4.2 se muestran los valores experimentales de flujo de agua obtenidos a distintos valores de presión transmembrana para la membrana de 0.14 μm antes de ser utilizada para la filtración. Por tanto, de acuerdo con la ecuación (4.3), la permeabilidad de referencia para esta membrana fue: $L_{0.14 \mu\text{m}} = 0.3624 \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar})$

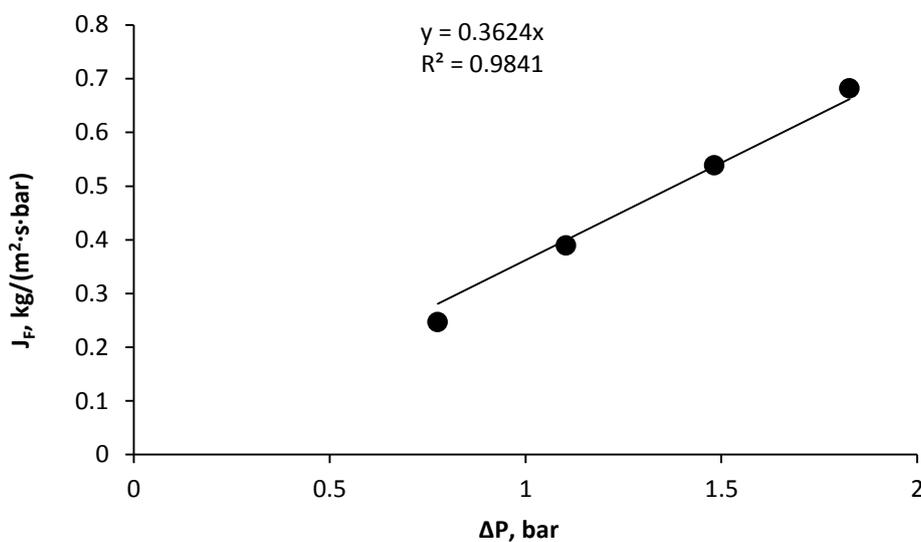


Figura 4.2. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana (ΔP) para la membrana de 0.14 μm .

4.2.1.2. Membrana de 50 kDa

Del mismo modo para la membrana de 50 kDa (Figura 4.3) se determinó la permeabilidad de la membrana virgen: $L_{50 \text{ kDa}} = 0.1208 \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar})$

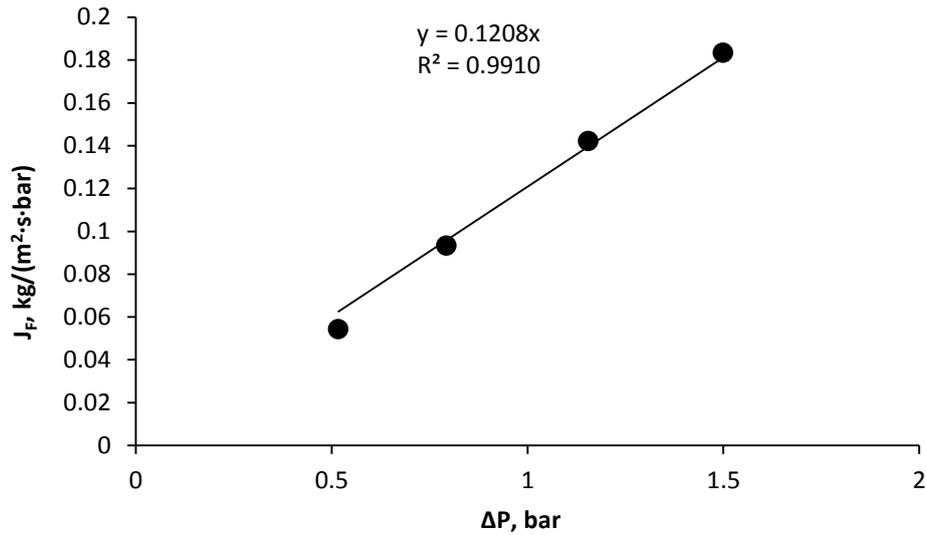


Figura 4.3. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana (ΔP) para la membrana de 50 kDa.

4.2.1.3. Membrana de 15 kDa

La permeabilidad para la membrana de 15 kDa fue 0.0420 kg/(m²·s·bar). Los valores de flujo de filtrado y presión transmembrana se presentan en la Figura 4.4.

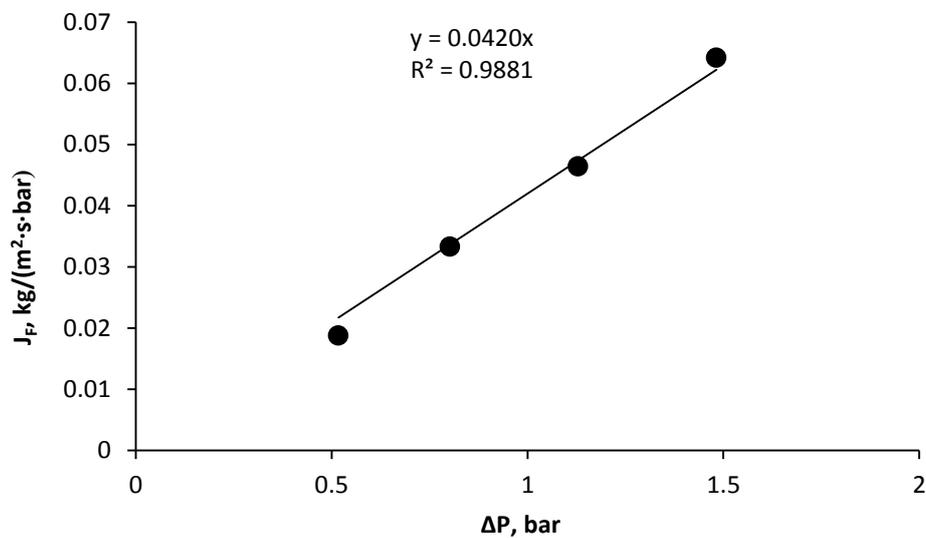


Figura 4.4. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana (ΔP) para la membrana de 15 kDa.

4.2.1.4. Membrana de 3 kDa

Por último, para la membrana de 3 kDa (Figura 4.5), la permeabilidad de referencia fue $L_{3kDa} = 0.0238$ kg/(m²·s·bar).

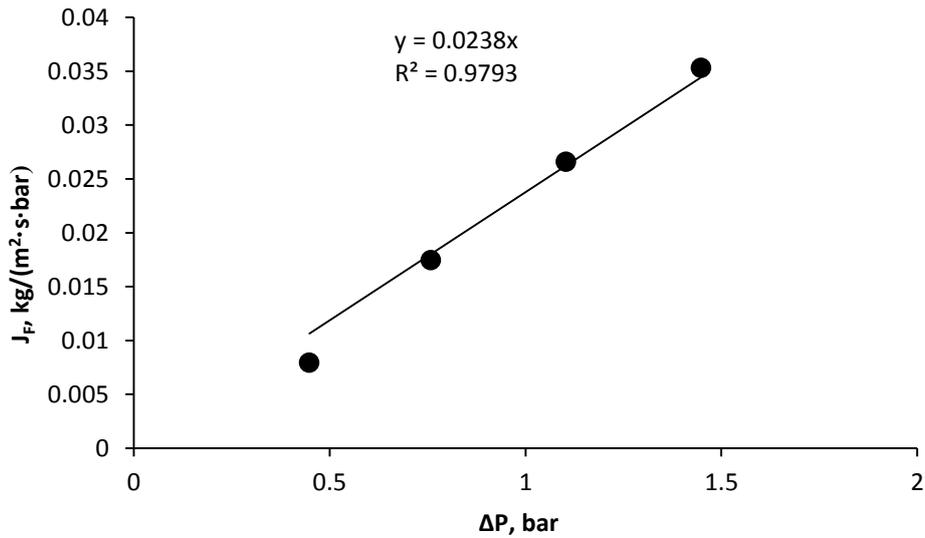


Figura 4.5. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana (ΔP) para la membrana de 3 kDa.

4.2.2. Dispositivo experimental

El sistema utilizado se esquematiza en la Figura 4.6 y en la Figura 4.7 se muestra una fotografía de dicho dispositivo.

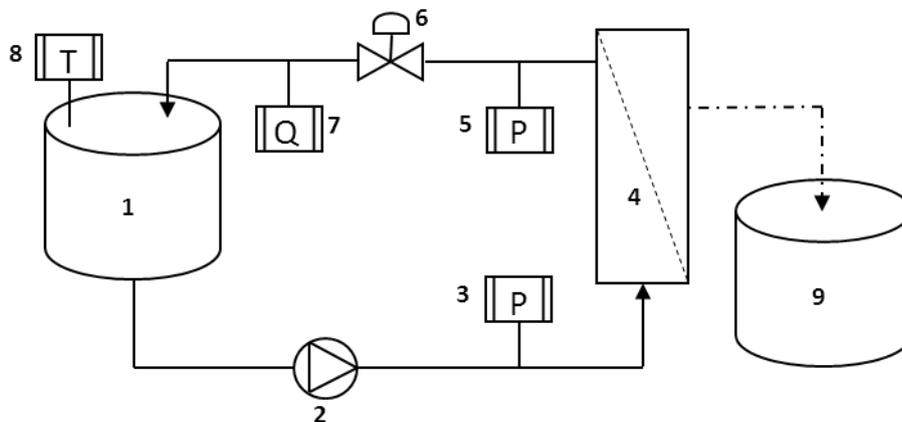


Figura 4.6. Dispositivo experimental de filtración.

La alimentación se introdujo en un tanque de acero inoxidable de 6 L (1) que se encontraba en baño termostático (Selecta, España). La temperatura de la alimentación se monitorizó con un termómetro digital (8) (Hanna Instrument HI 98509, USA). La alimentación se bombeó mediante una bomba de desplazamiento positivo (2) (motor de 0.56 kW y cabezal Procom, USA) a través de un módulo de membrana cerámica tubular (4). La velocidad de la bomba se controló mediante un variador de frecuencia (Omron Sysdrive 3G3JV, Japón) y la presión se controló mediante una válvula de membrana (6). La presión del sistema se midió mediante 2

manómetros (Wika, 1-60 psi, USA) a la entrada (3) y a la salida (5) de la membrana, el caudal se midió mediante un caudalímetro magnético (7) (Badger-Meter Type Food Primo V11, Alemania). En todos los ensayos se operó en modo concentración, por lo que el filtrado se recogió continuamente en un recipiente (9) que fue pesado en una balanza analítica (Mettler Toledo PB 1502-S, Switzerland), lo que permitió la determinación experimental del flujo.

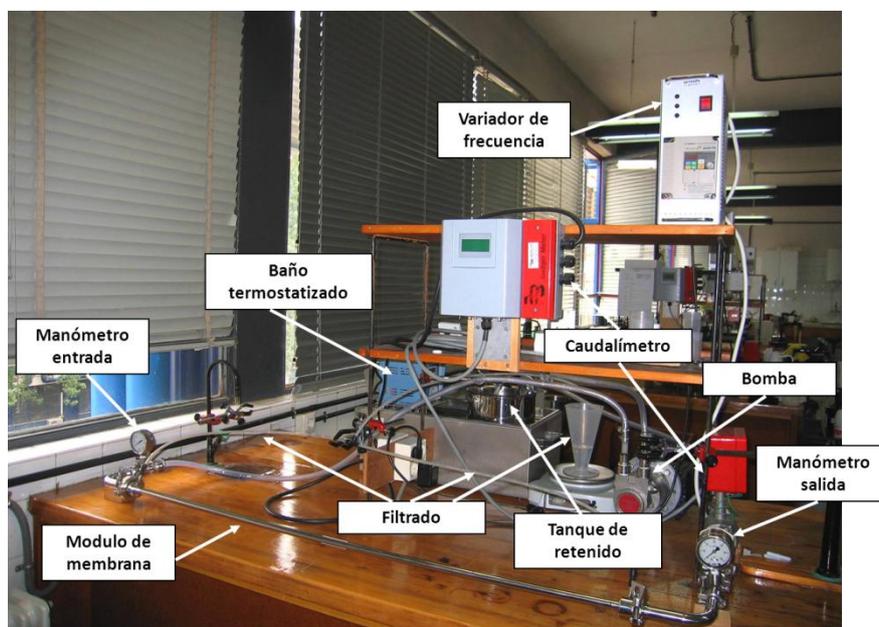


Figura 4.7. Fotografía del dispositivo experimental.

La operación de filtración se detuvo cuando se alcanzó el factor de concentración (FC) deseado o bien cuando se detectó una caída de flujo del 70 %. Caídas de flujo mayores podrían dañar la membrana irreversiblemente. El factor de concentración se calcula mediante la ecuación (4.4).

$$FC = \frac{V_{inicial}}{V_{retenido}} \quad (4.4)$$

4.2.3. Modelado del flujo de filtrado

El ensuciamiento o colmatación de la membranas es un factor clave que en la viabilidad económica del proceso que afecta esencialmente al flujo de filtrado obtenido y a su estabilidad con el tiempo. El comportamiento del ensuciamiento en una membrana viene determinado por cómo los compuestos se comportan en las inmediaciones de la membrana. Los solutos ensucian la membrana interaccionando con ella y bloqueando sus poros. Como se muestra en la Figura 4.8 existen varios modelos de bloqueo de poro en función de la forma y tamaño del soluto y el tamaño del poro:

- a) Bloqueo completo: las partículas individuales bloquean los poros sin superponerse unas sobre otras.
- b) Bloqueo interno: las partículas se depositan sobre el interior de los poros
- c) Bloqueo parcial: obstrucción parcial de los poros, puede haber superposiciones de las partículas depositadas
- d) Formación de torta: las partículas forman una capa sobre la superficie de la membrana.

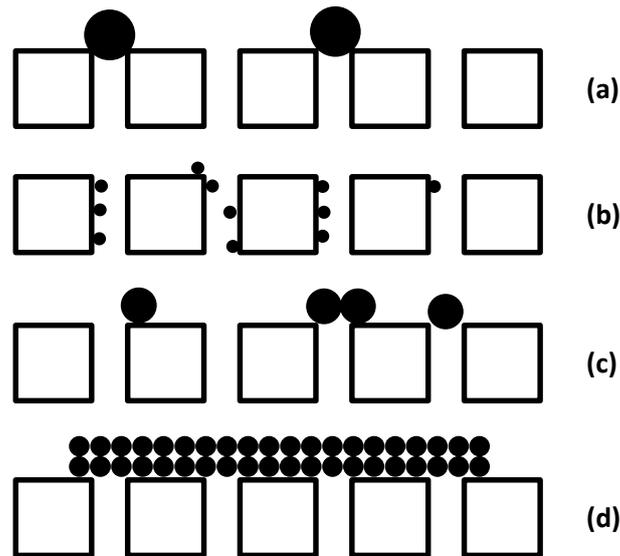


Figura 4.8. Mecanismos de ensuciamiento de membrana: (a) bloqueo completo de poro; (b) bloqueo parcial de poro; (c) bloqueo interno de poro; (d) formación de torta (Field et al., 1996).

Field (1995) basándose en las ecuaciones de filtración transversal a presión constante para estos tipos de ensuciamiento (Hérmia, 1982), establece un modelo matemático unificado capaz de describir la caída de flujo del filtrado en la filtración tangencial. En esta adaptación, se tiene en cuenta la influencia de la velocidad tangencial en la eliminación de los agentes de ensuciamiento de la superficie de la membrana para cada modelo de ensuciamiento:

$$-\frac{dJ}{dt}(J^{n-2}) = k(J - J^*) \quad (4.5)$$

donde J^* se considera el flujo por debajo del cual no existiría ensuciamiento. Algunos autores consideran este flujo como el valor límite (J_{lim}) que alcanza el flujo de filtrado en condiciones de estado estacionario (de Barros et al., 2003). El coeficiente fenomenológico k depende del mecanismo de ensuciamiento, mientras que n indicaría el tipo de mecanismo de ensuciamiento. A partir de la ecuación (4.5) se podrían obtener cada una de las ecuaciones para los modelos de bloqueo de acuerdo al valor que tome el índice n .

En el caso del bloqueo completo de poros ($n=2$) se asume que el flujo disminuye debido a la deposición de partículas que bloquean los poros de la membrana y disminuyen el área de filtración efectiva. En este tipo de bloqueo las moléculas que taponan los poros son de un tamaño mayor que éstos. El flujo se expresaría matemáticamente mediante la ecuación (4.6):

$$J = J_{\text{lim}} + (J_0 - J_{\text{lim}}) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (4.6)$$

donde J es el flujo de filtrado, J_0 es el valor inicial ($t = 0$) del flujo de filtrado, J_{lim} es el valor límite del flujo de filtrado en estado estacionario y k_2 es una constante relacionada con la cinética del bloqueo de poros.

Para el modelo de bloqueo interno de poros ($n=1.5$), se considera que las partículas quedan depositadas o adsorbidas en el interior de los poros reduciendo el volumen del poro. Las partículas que bloquean el poro son evidentemente más pequeñas que el poro al que bloquean. El ensuciamiento es independiente de la velocidad de flujo y no hay valor límite para el flujo ($J_{\text{lim}} = 0$). En este caso, la ecuación para flujo tangencial, ecuación (4.7), coincide con la de flujo transversal:

$$\frac{1}{J^{0.5}} = \frac{1}{J_0^{0.5}} + \left(\frac{K_s'}{2} \right) \cdot A^{0.5} \cdot t \quad (4.7)$$

donde J y J_0 representan el flujo de filtrado y el flujo inicial de filtrado, respectivamente, A es el área de la membrana y K_s' es el parámetro de Hermia definido para el bloqueo de poro estándar o interno que se relaciona con la disminución del área efectiva de los poros por unidad de volumen total de filtrado.

En el bloqueo de poro parcial o intermedio ($n = 1$) las partículas grandes podrían sellar poros completamente, sin embargo el bloqueo no sería permanente alternándose el bloqueo y desbloqueo del poro. Este tipo de bloqueo se da cuando el diámetro de las moléculas de soluto presenta tamaños similares al del poro. Por este motivo, en ocasiones las moléculas de soluto pueden obstruir la entrada a un poro sin bloquearlo completamente. La ecuación que representa a este modelo es:

$$k_1 \cdot t = \frac{1}{J_{\text{lim}} \cdot \ln \left[\left(\frac{J_0 - J_{\text{lim}}}{J_0} \right) \cdot \left(\frac{J}{J - J_{\text{lim}}} \right) \right]} \quad (4.8)$$

donde k_1 representa el área bloqueada de la membrana por unidad de volumen. La ecuación anterior se puede transformar para poder calcular el flujo fácilmente, quedando de la siguiente forma:

$$J = \frac{J_0 \cdot J_{\text{lim}} \cdot e^{(k_1 \cdot J_{\text{lim}} \cdot t)}}{J_{\text{lim}} + J_0 (e^{(k_1 \cdot J_{\text{lim}} \cdot t)} - 1)} \quad (4.9)$$

En el caso de la formación de torta ($n = 0$), las partículas deben ser de mayor diámetro que el poro, por lo que no se acumularían en el exterior formando una torta en la superficie de la membrana. La resistencia total sería la suma de la resistencia de la membrana y la de la torta. El modelo quedaría de la siguiente manera:

$$k_0 \cdot t = \frac{1}{J_{\text{lim}}^2} \cdot \ln \left[\left(\frac{J}{J_0} \cdot \frac{J_0 - J_{\text{lim}}}{J - J_{\text{lim}}} \right) - J_{\text{lim}} \left(\frac{1}{J} - \frac{1}{J_0} \right) \right] \quad (4.10)$$

donde k_0 es la constante de filtración del modelo de torta que relaciona la masa de capa gel por unidad de área de membrana con el volumen de permeado filtrado.

Con el fin de modelar el comportamiento del flujo de filtrado en los experimentos de purificación de péptidos, los datos experimentales fueron ajustados mediante regresión no lineal a las expresiones de cada uno de los modelos de ensuciamiento, obteniendo en cada caso el valor de los parámetros así como un coeficiente de correlación que indica la bondad del ajuste.

4.2.4. Limpieza

La limpieza consiste en una serie de etapas que buscan recuperar la capacidad de filtración de la membrana después de una filtración. El protocolo de limpieza empleado constó de 3 etapas:

- Enjuague I. Se realizó justo después de la filtración. Una vez que se eliminaron los restos de leche del circuito, se hizo pasar agua des-ionizada a temperatura ambiente durante 15 s sin aumentar la presión del sistema. Ni retenido ni filtrado se recircularon durante esta etapa. La duración de este enjuague fue corto para evitar que se afectara la resistencia de colmatación (Cabero et al., 1999).
- Limpieza. Para la limpieza se empleó una disolución de 20 g/L de NaOH y 2g/L de dodecilsulfato sódico (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) que actúa como agente de superficie. Esta disolución se hizo pasar por la membrana en modo de recirculación total con una velocidad de 3.3 m/s y 50 °C de temperatura. La concentración de agente básico y la

temperatura se escogieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Temperaturas superiores a 50 °C pueden provocar una disminución en el flujo máximo obtenido durante la etapa de limpieza (Bartlett et al., 1995), mientras que temperaturas inferiores tienen menores eficacias de limpieza. Durante los primeros 5 min se trabajó con la válvula totalmente abierta. Posteriormente se aplicó una ΔP de 1 bar y se continuó la operación durante 25 min más. La aplicación de una baja ΔP en los primeros momentos de la limpieza permite un mejor desempeño del agente de limpieza ya que los contaminantes no son forzados a entrar en los poros de la membrana (Blanpain-Avet et al., 2004).

- Enjuague II. Se realizó después de la limpieza y consta de 2 etapas. La primera consistió en un enjuague igual al descrito previamente en el procedimiento del enjuague I. En la segunda, se circuló agua por el sistema a una velocidad de 3.3 m/s, ΔP de 1 bar y temperatura ambiente. El retenido se recirculó continuamente mientras que el filtrado se desechó. Esta segunda etapa se mantuvo hasta que el permeado alcanzó pH neutro.

4.2.4.1. Eficiencia de la limpieza

Para comprobar la efectividad de las limpiezas, se determinó la resistencia hidráulica de la membrana después de la filtración y después de la limpieza. Partiendo de la ecuación (4.1) y asumiendo que la resistencia total que proporciona la membrana se debe a la contribución de la resistencia del material filtrante (la resistencia intrínseca de la membrana, R_M) y la que proporciona los depósitos de fouling (R_F) generados en la filtración, la resistencia hidráulica total se podría definir:

$$R_T = \frac{J_F}{\Delta P} \quad (4.11)$$

donde R_T (resistencia hidráulica total) es la suma de las resistencias de la membrana (R_M) y de colmatación (R_F). J_F el flujo de filtrado y ΔP la presión transmembrana.

Esta resistencia total fue calculada para la membrana después de la etapa de filtración y después de la etapa de limpieza. El procedimiento seguido fue igual al desarrollado para determinar resistencias intrínsecas de las membranas (apartado 4.2.1). Para ello, se pasó agua a 50 °C a través de la membrana con una velocidad de 3.3 m/s midiendo el flujo de filtrado a distintos valores de ΔP . De acuerdo con la ecuación (4.11), la resistencia se determinó calculando la inversa de la pendiente de la recta resultante al representar el flujo frente a la ΔP .

Para cada membrana se puede definir un índice de eficacia de limpieza, definido por la ecuación:

$$E = \frac{(R_0 - R_{NaOH})}{(R_0 - R_M)} \cdot 100 \quad (4.12)$$

donde R_M es la resistencia intrínseca de la membrana (determinada en el apartado 4.2.1), R_0 es la resistencia hidráulica después de la etapa de concentración y R_{NaOH} es la resistencia determinada después de llevar a cabo el proceso de limpieza. Este índice de eficiencia representa el porcentaje de eliminación de la resistencia de fouling después de la etapa de limpieza. Cuanto más cercano esté R_{NaOH} a la resistencia intrínseca, mayor será este índice. El máximo valor posible para el índice sería del 100 %, lo que indicaría una recuperación completa de la membrana.

4.3. HIDRÓLISIS

Dependiendo del volumen de muestra a hidrolizar se utilizaron 2 montajes representados en la Figura 4.9 y Figura 4.10.

- (A) Para volúmenes de 200 mL se empleó un reactor de 250 mL encamisado. Por la camisa de calefacción se hizo pasar agua caliente procedente de un baño termostatzado (B3, Thermo-Haake; Karlsruhe, Alemania). La temperatura del agua de calefacción se ajustó en cada caso para mantener la temperatura constante en el interior del reactor. La agitación se generó mediante un agitador magnético (Agimatic-E, Selecta; Abrera, España) que se mantuvo en posición 500.

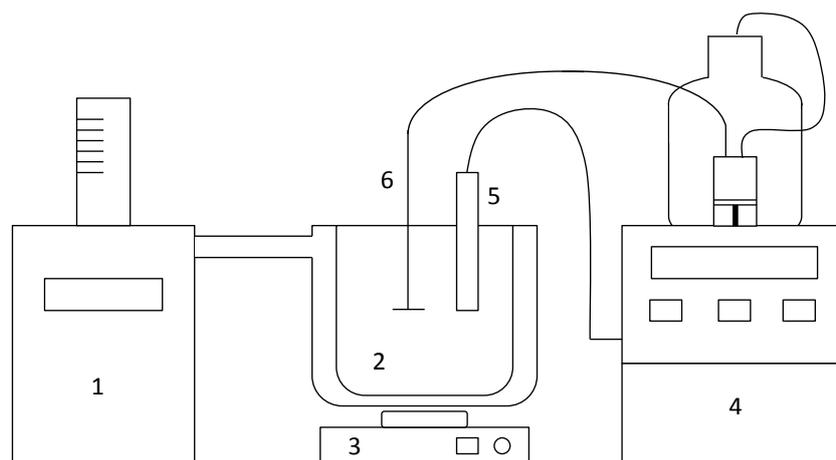


Figura 4.9. Esquema del montaje de hidrólisis (A), consistente en: baño termostático cerrado (1), reactor encamisado (2), agitador magnético (3), titrador automático (4), sonda de pH-T (5) y punta de dosificación (6).

(B) Para volúmenes mayores (2 L), el reactor usado consistió en un recipiente plástico introducido completamente en un baño termostático. En este caso y debido a la menor conductividad del plástico se optó por introducir el sustrato a la temperatura deseada en el reactor. La agitación se realizó mediante un agitador de ancla unido a un motor (RZR1, Heidolph; Schwabach, Alemania), que generó una agitación adecuada usándolo a la mínima potencia.

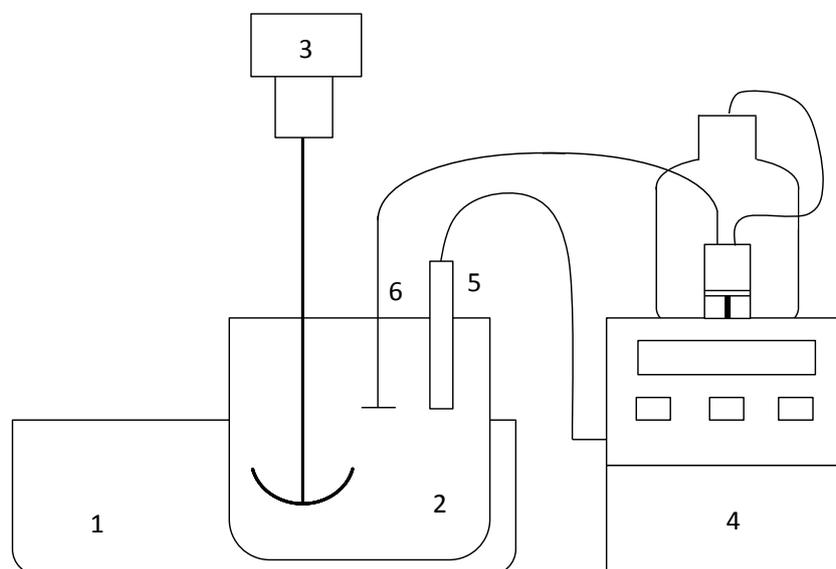


Figura 4.10. Esquema del montaje de hidrólisis (B), consistente en: baño termostático (1), recipiente 2 L (2), motor y agitador de ancla (3), titrador automático (4), sonda de pH-T (5) y punta de dosificación (6).

La reacción se llevó a cabo en medio básico, pH 8, lo que supone que durante la reacción de hidrólisis se generan protones al romper los enlaces peptídicos. Por tanto, para mantener el pH constante fue necesario adicionar base. Para controlar la reacción y monitorizar la evolución de la misma se empleó un titrador automático (718 Stat Titrino, Methrom; Herisau, Suiza). La unidad dispone de una sonda pH-temperatura y una bureta para dosificar la disolución de NaOH (1M o 4M según sea hidrólisis tipo A o B, respectivamente) manteniendo constante el pH.

Una vez fijados la temperatura y el pH de trabajo, se añadió la enzima para iniciar la reacción. Una vez finalizada, la enzima fue desactivada térmicamente. Para muestras obtenidas mediante procedimiento (A) la desactivación se produjo introduciendo la muestra en agua a 100 °C durante 15 min. En el caso de hidrólisis (B) el hidrolizado se desactivó calentándolo directamente a 90 °C durante 15 min. El hidrolizado, dependiendo de la finalidad, fue enfriado y conservado (nunca más de 4 días) a 4 °C para su posterior secado o purificación o bien congelado a -20 °C para su posterior análisis.

4.3.1. Determinación del grado de hidrólisis

Se define el grado de hidrólisis (DH) como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la reacción enzimática respecto a los iniciales. Se puede calcular de acuerdo a la siguiente expresión:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (4.13)$$

siendo h el número de equivalentes de enlaces peptídicos rotos por gramo de proteína y h_{tot} el número total de equivalentes de enlaces peptídicos por gramo en la proteína nativa. Este último se calcula a partir de la composición en aminoácidos de la proteína. En concreto, para las proteínas de la leche se establecen (Adler-Nissen, 1986) unos valores de 8.2 y 8.8 meqv/g correspondientes a caseínas y proteínas séricas, respectivamente.

Para la determinación del grado de hidrólisis se empleó el método del pH-estato. Esta técnica permite el seguimiento continuo del grado de hidrólisis mediante la medida de la cantidad de base añadida para mantener constante el pH durante el proceso. La ecuación que relaciona ambas variables es la siguiente (Adler-Nissen, 1986):

$$DH = \frac{V_B \times N_B}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (4.14)$$

donde, V_B es el volumen de base añadido (mL), N_B es la normalidad de la base, M_p es la masa de proteína (g) y h_{tot} es el número de enlaces peptídicos de la proteína original (meqv/g). α es el grado de disociación medio de los grupos amino liberados durante la hidrólisis. Este término es función del pH del medio y del pK medio de los grupos α -amino liberados y puede calcularse según (4.15):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (4.15)$$

A continuación se presentan los valores de la inversa del grado de disociación tabulados para distintas condiciones de temperatura y pH:

Tabla 4.3. Valores $1/\alpha$ para distintas condiciones de temperatura y pH (Adler Nissen, 1986).

pH	Temperatura, °C			
	30	40	50	60
6.5	-	-	5	3.50
7	5.00	3.00	2.27	1.79
7.5	2.27	1.63	1.40	1.25
8	1.40	1.20	1.13	1.08
8.5	1.13	1.06	1.04	1.03

La normalidad de la base se determinó por triplicado al comienzo y al final de un periodo de experimentos. Para ello se valoró la sosa mediante el patrón primario hidrogenoftalato de potasio (Panreac, Barcelona, España). El protón ácido de esta sustancia permite su reacción cuantitativa con sustancias que tengan propiedades básicas, como el hidróxido sódico. La determinación se llevó a cabo usando el mismo equipo empleado para la hidrólisis (718 Stat Titrimo, Methrom; Herisau, Suiza). Una cantidad exacta de ftalato (alrededor de 1 g) fue disuelta en agua (100 mL). La disolución de NaOH se adicionó lentamente sobre la de ftalato con agitación moderada hasta que se alcanzó pH 8.65 (25 °C). En ese punto el número de equivalentes de ftalato sería igual al de NaOH gastados, lo que permite el cálculo de la normalidad de la base.

4.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA *IN VITRO*

En general, los análisis de la actividad inhibidora de ACE fueron realizados con un método espectrofotométrico, excepto para el capítulo de "Purificación de péptidos inhibidores ACE con membranas", en el que se empleó un ensayo fluorométrico.

4.4.1. Método espectrofotométrico

El ensayo empleado para la determinación de la actividad inhibidora de ACE en este trabajo fue el originalmente propuesto por Holmquist et al., (1979) y posteriormente modificado por Vermeirssen et al. (2002) y Shalaby et al. (2006). Este método se basa en la medida de la disminución de la absorbancia producida al hidrolizar el tripeptido (FAPGG, Sigma-Aldrich, USA) con la enzima convertidora de la angiotensina. Este descenso de la absorbancia es una medida de la actividad de la enzima. Como se comentó anteriormente este ensayo presenta ventajas frente a otros, destacando la rapidez y exactitud de sus medidas.

La reacción se llevó a cabo en micro-placa de 96 pocillos. En primer lugar se añadió a cada pocillo 10 μ L de disolución de enzima 0.25 U/mL (EC 3.4.15.1; A6778, Sigma-Aldrich, USA) más 10 μ L de muestra. En el caso de la muestra control en lugar de muestra se añadió agua desionizada. A continuación se precalentó la placa durante 15 min a 37 °C. Seguidamente se añadieron 150 μ L de la disolución de sustrato (0.88mM FAPGG en buffer 50 mM Tris-HCl a pH 7.5 con una concentración de NaCl de 300 mM) atemperada a 37 °C. Una vez añadido el sustrato comienza la reacción, por lo que la adición de éste debe realizarse lo más rápido posible, con el fin de que no existan diferencias entre unos pocillos y otros. Inmediatamente después de añadir el sustrato, la placa se introdujo en el lector de placas (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Finlandia) termostatzado a 37 °C. Tras 5 s de agitación se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 s durante 30 min. Cada muestra se analizó por triplicado.

A modo de ejemplo, tomando como inhibidor de referencia el captopril, uno de los primeros inhibidores orales de ACE desarrollados, se puede observar el descenso lineal que se produce en los valores de absorbancia con el tiempo (Figura 4.11).

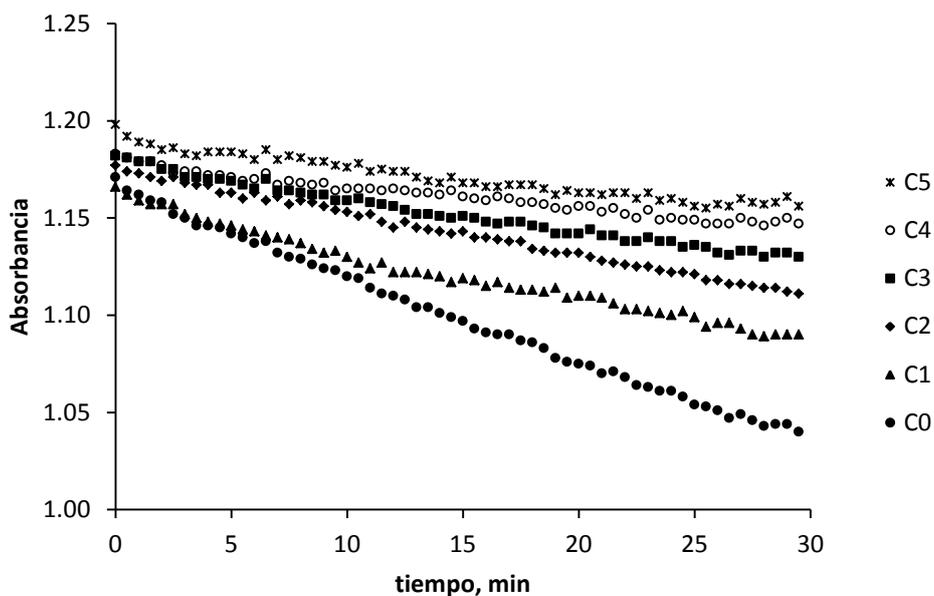


Figura 4.11. Medida de absorbanza en función del tiempo en el análisis de inhibición de ACE. C0: muestra sin inhibidor; C1-C5: concentraciones crecientes de captopril.

La pendiente de estas líneas es el parámetro que se usa para comparar la actividad enzimática, teniendo en cuenta que el 100 % de actividad ACE vendría dado por la pendiente de C0 (muestra sin inhibidor). Debido a su mejor linealidad, los datos de absorbanza comprendidos entre el minuto 10 y el 25 fueron los utilizados para la determinación de la pendiente. Para el cálculo del porcentaje de inhibición de ACE, la pendiente de la muestra control (agua) representaría el 100 % de la actividad de ACE. Por tanto, el porcentaje de inhibición de una muestra dada se calcula:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{p_i}{p_c} \right) \times 100 \quad (4.16)$$

donde p_i y p_c son las pendientes de la muestra inhibidora y del control, respectivamente.

Para determinar el valor de IC_{50} es necesario analizar distintas concentraciones del inhibidor a estudiar, como indica la Figura 4.11. Representando el logaritmo de las concentraciones ensayadas frente a la inhibición de ACE determinada para cada concentración de inhibidor, se obtiene una curva sigmoidea (Figura 4.12). La parte central de la misma se puede ajustar a una recta y de esta forma determinar la concentración de inhibidor necesaria para producir una inhibición del 50 %. Para el caso concreto del ejemplo (captopril) se obtuvo un valor de IC_{50} de 3.85 nM.

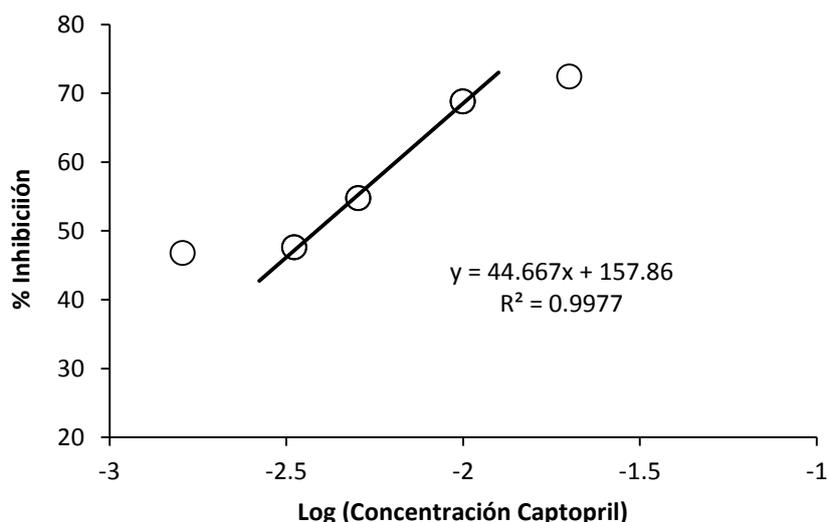


Figura 4.12. Gráfica para la determinación del valor IC_{50} de Captopril.

Con el fin de poder preparar diluciones a distintas concentraciones, los hidrolizados de proteínas de leche de cabra se secaron previamente mediante liofilización. Las disoluciones más concentradas presentaron valores de absorbancia excesivamente altos, lo que originó problemas en la medida. Para solucionarlo, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 10 min (Sigma Laborzentrifugen 6K15, Osterode am Harz, Alemania), de forma que el líquido clarificado mantuvo la actividad inhibidora de ACE respecto a la disolución original, por lo que pudo ser usado para el análisis.

4.4.2. Método fluorométrico.

El método utilizado fue una variación del desarrollado por Sentandreu Toldra (2006) basado en la hidrólisis del sustrato o-aminobenzonilglicil-p-nitro-L-fenilalanil-prolina (ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro) (Bubendorf, Switzerland). La enzima convertidora de la angiotensina provoca la liberación del grupo fluorescente (ABZ-Gly) lo que genera un aumento en la fluorescencia.

El ensayo se llevó a cabo en microplacas negras de 96 pocillos midiendo la absorbancia en un fluorímetro (Tecan Genios Plus). En cada pocillo se añadieron 50 μ L de disolución ACE (6 mU/mL) preparada sobre 150 mM Tris-base, pH 8.3 y 50 μ L de disolución de muestra preparada, siempre que sea posible, con el mismo buffer. El control fue preparado de forma similar, con agua en lugar de muestra. La microplaca fue agitada y pre incubada durante 10 min a 37 °C. La reacción se inició adicionando a cada pocillo 200 μ L de 0.45 mM ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro en 150 mM Tris-Base buffer (pH 8.3) con 1.125 M NaCl. La fluorescencia

generada fue medida cada minuto durante 30 min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 360 y 450 nm, respectivamente. Las muestras se analizaron por triplicado.

Como en el ensayo espectrofotométrico, los datos de fluorescencia son lineales con el tiempo, por lo que la actividad de la enzima puede calcularse tomando la pendiente. De la misma forma que antes, la inhibición de ACE fue calculada usando la pendiente del control como el 100 % de la actividad de la enzima:

$$I \% = \left(1 - \frac{P_i - P_{ABZ+i}}{P_c - P_{ABZ}} \right) \times 100 \quad (4.17)$$

donde p_i es la pendiente de la muestra y p_c es la pendiente en ausencia de muestra (inhibidor). Por otro lado, p_{ABZ} y p_{ABZ+i} son las pendientes de los blancos, el primero sólo contiene sustrato y el segundo sustrato con inhibidor, en ninguno de los dos se añadió ACE.

La determinación del IC_{50} se realizó de forma similar al método espectrofotométrico descrito anteriormente. Para algunas de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión de tamaños, la concentración de proteína no fue suficiente para conseguir inhibiciones superiores al 50 %. En estos casos fue necesario concentrar la fracción, para ello se centrifugó (1000 g, 25 °C) a vacío (0.001 bar) durante 16 h.

4.5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

4.5.1. Método Lowry

La concentración de proteína de las muestras de sustrato e hidrolizados secos fueron determinadas con el ensayo espectrofotométrico de Lowry usando el Kit que comercializa Sigma (Micro Lowry – Peterson's modification, Sigma-Aldrich, USA).

El procedimiento se basa en dos reacciones químicas. La primera es la reacción de Biuret, en la que el reactivo alcalino compuesto por iones cobre y tartato (reactivo Lowry) forma complejos con los enlaces de la proteína. Seguidamente se produce la reducción con el reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotungstico) que genera el color púrpura.

A cada mL de muestra se le añadió 1 mL de reactivo Lowry y se dejó reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió el reactivo Folin y se agitó la mezcla vigorosamente. Se dejó desarrollar el color durante 30 min y se midió la absorbancia a 650 nm.

La medida se realizó en cubetas de 500 μL en un espectrómetro de doble haz (Varian Cary 110 Bio, USA) midiendo cada muestra frente al blanco.

Cada muestra se midió por triplicado. En el caso del blanco, en lugar de 1 mL de muestra se añadió agua Milli-Q. Para determinar la concentración de proteína se preparó una curva patrón (Figura 4.13) con seroalbúmina bovina (BSA) a las concentraciones de: 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$.

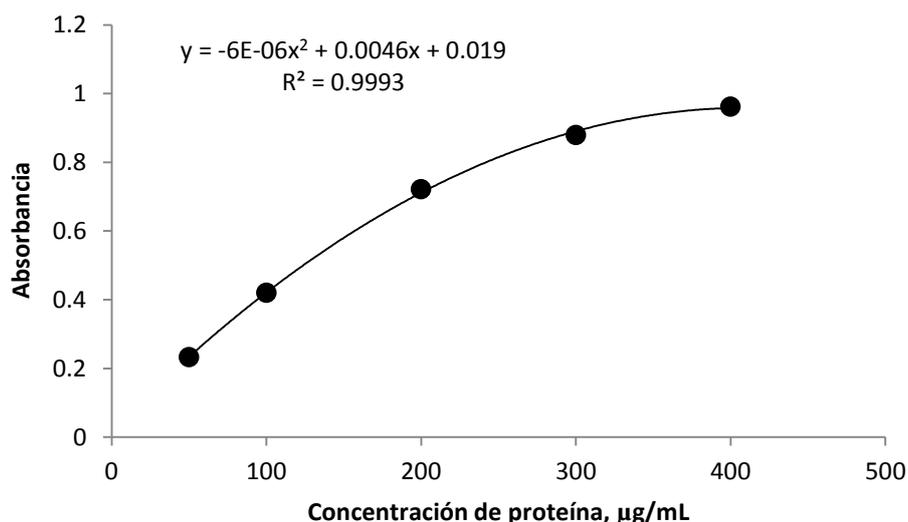


Figura 4.13. Curva patrón de BSA para la determinación de proteína mediante el método Lowry.

4.5.2. Método ácido bicinónico

El contenido proteico de las fracciones obtenidas por SEC se determinó mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinónico, empleando el ensayo de diagnóstico de Sigma (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, USA).

El ensayo es similar al método de Lowry, en primer lugar se produce la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} por parte de las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret). La interacción del Cu^{+1} con 2 moléculas de ácido bicinónico da lugar a un complejo de color azul-púrpura con un máximo de absorción a 562 nm.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos (Sterilin Ltd., UK). En cada pocillo se añadió 0.25 μL de muestra y 200 μL de disolución BSA. La placa se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, seguidamente se midió la absorbancia a 562 nm en un lector Multiskan EX (Labsystems OY, Finland). La disolución de BSA se preparó de acuerdo con las instrucciones del Kit, disolviendo

50 partes de reactivo A (ácido bicinónico, carbonato sódico, tartrato sódico y bicarbonato sódico en NaOH 0.1 N) por 3 partes de reactivo B (disolución de sulfato cúprico al 4 %).

Cada muestra se analizó por triplicado. El blanco se determinó añadiendo agua Milli-Q en lugar de muestra. Para la curva de calibrado (Figura 4.14) se prepararon concentraciones de BSA de 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL.

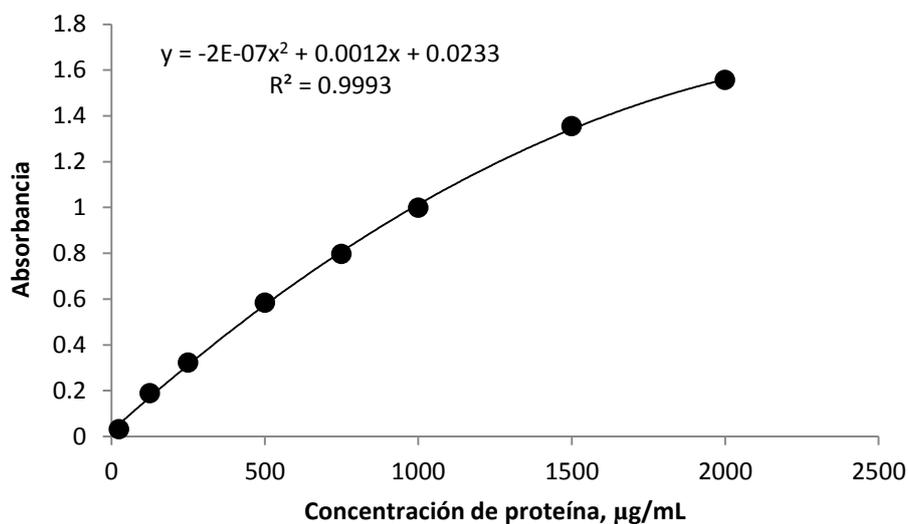


Figura 4.14. Curva patrón de BSA para la determinación de proteína mediante el método de BCA.

4.6. FRACCIONAMIENTO DE HIDROLIZADOS

El análisis de las distintas fracciones de péptidos que componen el hidrolizado se realizó mediante cromatografía de exclusión de tamaños (SEC). Para ello se empleó un equipo FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Suecia) con una columna empaquetada con gel de filtración Superdex™ 30 prep. grade (2.6 x 61 cm; Amersham Biosciences, Hillerød, Denmark)

El flujo de la fase móvil, hidrogenocarbonato amónico 0.1 M y pH 8, fue de 2.5 mL/min. Para cada muestra se inyectaron 5 mL de una disolución del hidrolizado (70 mg proteína/mL) preparado en el buffer usado como fase móvil. El efluente se monitorizó a 280 nm y se recogieron fracciones de 10 mL que posteriormente fueron agrupadas de acuerdo al cromatograma obtenido.

La columna se calibró con 8 estándares de diferentes pesos moleculares: BSA (PM= 66430 g/mol), citocromo C (PM= 12327 g/mol), Insulina (PM= 5733 g/mol), Insulina B (PM= 3495.9 g/mol), angiotensina I (PM= 1296.5 g/mol), Leu-encefalina (PM= 555.6 g/mol), Gly-Tyr (PM=

238 g/mol) y L-Trp (PM= 204.3 g/mol). La curva de calibrado obtenida se representa en la Figura 4.15.

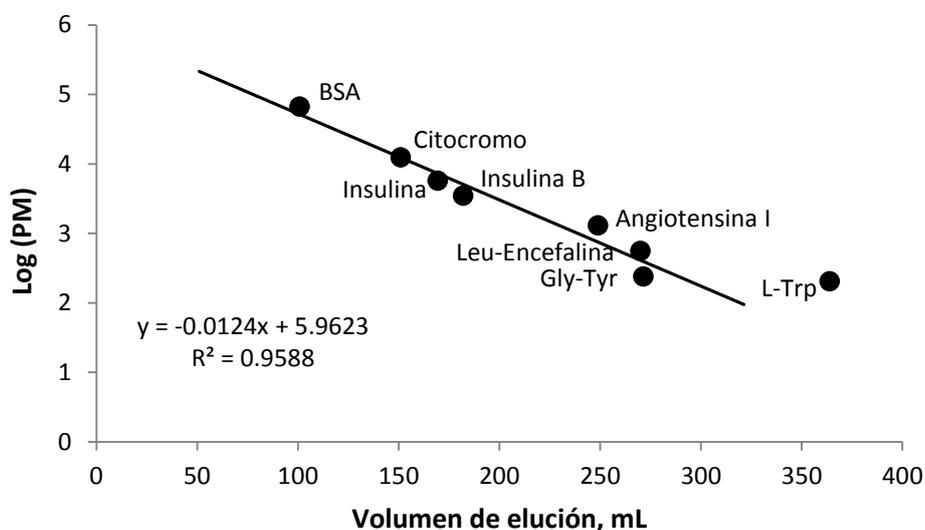


Figura 4.15. Curva de calibración para cromatografía de exclusión de tamaños.

4.7. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS

Los análisis para la identificación de péptidos se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía líquida conectado con un espectrómetro de masas (Agilent 1100 LCMSD Trap, Agilent Technologies A/S, Dinamarca) controlado mediante el software LC/MSD Trap Control Software, versión 4.1. Para la separación cromatográfica se empleó una columna Zorbax 300SB C18 (2.1 x 150mm², 5µm, Agilent Technologies A/S, Dinamarca).

El flujo de fase móvil se fijó en 0.25 mL/min usando un gradiente consistente en 100 % de disolvente A durante los primeros 5 min seguido de un incremento lineal hasta alcanzar el 50 % de disolvente B durante 75 min. El disolvente A consistió en una mezcla de agua y ácido trifluoroacético al 0.1 % y el disolvente B fue una mezcla de 90 % acetonitrilo, 0.1 % de ácido trifluoroacético y agua. La columna se lavó con 100 % de disolución B durante 16 min y se reequilibró con 0 % de B durante 11 min más antes de inyectar una nueva muestra. La absorbancia del efluente de la columna fue medida a 210 y 280 nm.

El espectrómetro empleó nitrógeno como gas nebulizador y de secado a una presión de 50 psi y un flujo de 9 L/min. La temperatura de secado fue de 300 °C. Los espectros de masas se adquirieron en un intervalo entre 50 y 2200 m/z y la masa objetivo se estableció en 1521 m/z.

Para la obtención de los perfiles peptídicos, los hidrolizados (previamente liofilizados) se disolvieron en agua Milli-Q a una concentración de 20 mg/mL, inyectando 5 μ L de la disolución preparada para cada muestra. Por otro lado, para la identificación de péptidos en las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión de tamaños se empleó un volumen de inyección de 25 μ L para cada una de las fracciones obtenidas.

Los datos espectrales se procesaron y transformaron en valores de masa mediante el programa Data Analysis (version 3.0, Bruker Daltonik). El programa Bruker Daltonics BioTools (versión 3.0., Bruker Daltoniks) se empleó para procesar los espectros masas/masas (MS/MS) y llevar a cabo la secuenciación de los péptidos. Para ello, estos espectros fueron comparados con fragmentos teóricos de la misma masa que podrían ser encontrados en la secuencia primaria de las proteínas de leche de cabra. Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos Swissprot ((α_{S2} -caseína P33049, α_{S1} -caseína P18626, κ -caseína P02670, y β -caseína, P33048)

4.8. DIGESTIÓN *IN VITRO*

Para comprobar la resistencia de los hidrolizados de leche de cabra a la degradación de las enzimas digestivas, se les sometió a una digestión gastrointestinal simulada. Para ello se siguió el método de Garret et al. (1999) con algunas modificaciones. El estudio consta de 2 fases, digestión gástrica y digestión gastrointestinal.

La digestión gastrointestinal se llevó a cabo en un reactor encamisado de 250mL al que se añadió 2.7 g de hidrolizado (previamente liofilizado por motivos de conservación). A continuación se disolvió el liofilizado con agua hasta alcanzar una concentración de proteína de 10 mg/mL. La mezcla reaccionante se agitó mediante agitador magnético a 500 rpm (Selecta, Abrera, España) y se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C mediante la circulación de agua caliente a través de la camisa de calefacción.

Una vez que la mezcla fue homogénea y se alcanzaron los 37 °C se disminuyó el pH con ácido clorhídrico 1M hasta pH 2. En ese momento se añadió una disolución 40 mg/mL de pepsina (107185, Merck, Darmstadt, Alemania) en HCl 0.1M, en una relación enzima sustrato del 4 % (w/w). Transcurrida 1 h desde el inicio de la reacción con pepsina se añadió disolución 0.9 M NaHCO₃ para aumentar el pH hasta 5.3 y reducir la actividad de la pepsina.

Para los experimentos de digestión gástrica el proceso finalizó en este punto, desactivando la enzima térmicamente.

En el caso de los experimentos de digestión gastrointestinal, la digestión continuó añadiendo pancreatina (un preparado enzimático procedente del páncreas de cerdo que contiene amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasas; P1625, Sigma-Aldrich, USA) en una relación E/S de 4 % (w/w). La disolución de la enzima se preparó previamente a una concentración de 2 mg pancreatina/mL en una solución de NaHCO_3 0.1M. Inmediatamente después de añadir la enzima se aumentó el pH hasta 7.5 con NaOH 1M. La reacción se mantuvo a 37 °C con agitación durante 2 h. Transcurrido este tiempo la reacción se detuvo desactivando la enzima como en el caso de la digestión gástrica.

Una vez desactivadas tanto las muestras de la digestión gástrica como las de la gastrointestinal se liofilizaron para posteriormente analizar su actividad inhibidora de ACE (IC_{50})

4.9. SECADO POR ATOMIZACIÓN

El secado por atomización de los hidrolizados se llevó a cabo en un secadero de laboratorio Büchi 190 (Flawill, Suiza), esquematizado en la Figura 4.16.

La entrada de aire se encuentra en la parte superior del equipo (2) donde se encuentra una resistencia eléctrica (5) que calienta el aire hasta la temperatura deseada. El aire entra por la parte superior de la cámara de secado (6) donde se encuentra el atomizador (3) que pulveriza la corriente de alimentación (1) mediante aire comprimido (4). Las pequeñas gotas se secan y son arrastradas por el aire hasta el ciclón (7) donde son separadas. Las partículas son recogidas en el recipiente de producto (8) mientras que el aire sale al exterior libre de partículas. A la salida del ciclón se encuentra el ventilador de aspiración (9) que genera la circulación de aire en el equipo. Dos sondas de temperatura (10) controlan la temperatura del aire a la entrada y a la salida de la cámara de secado.

El secado del hidrolizado se realizó siempre a caudal de aire de 25 Nm^3/h , que representa un caudal adecuado para arrastrar las partículas hasta el ciclón y evitar que se escapen con el aire. Por el atomizador de 0.5 mm de diámetro se hizo pasar 600 L/h de aire comprimido, lo que proporcionó un tamaño de gota adecuado.

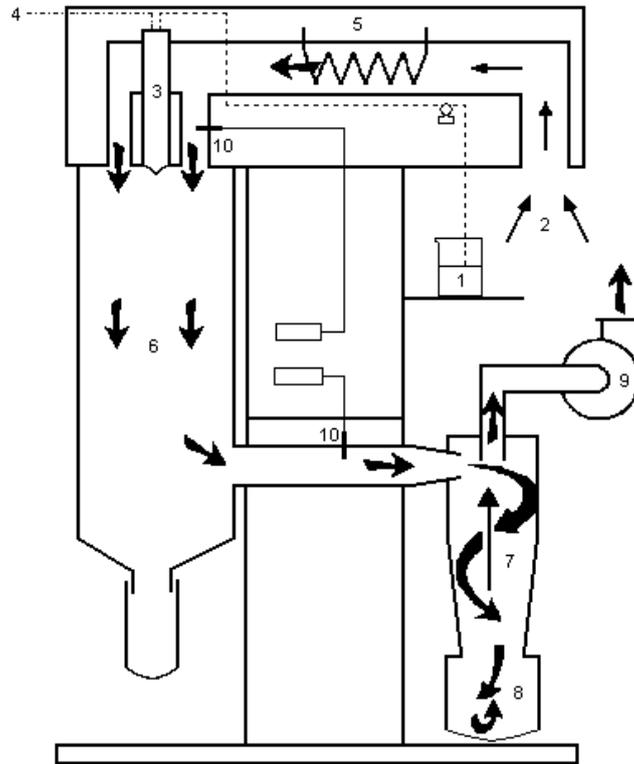


Figura 4.16. Esquema de secadero por atomización.

La temperatura y el caudal de alimentación se fijaron para cada experimento de acuerdo a las condiciones experimentales. La curva de calibrado obtenida para la bomba peristáltica de alimentación se representa en la Figura 4.17.

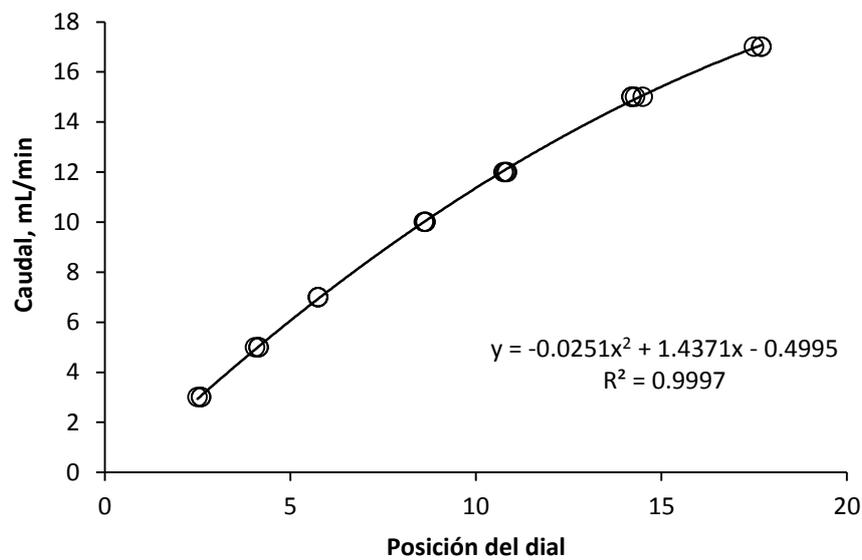


Figura 4.17. Curva de calibración de bomba la peristáltica del secadero por atomización.

El procedimiento de operación para cada experimento consistió en:

- Periodo de calentamiento. En primer lugar se activó la resistencia eléctrica del dispositivo para calentar el aire a la temperatura de entrada deseada (T). Una vez alcanzada T se comenzó a bombear agua al caudal establecido para el experimento con el fin de estabilizar la temperatura de salida (Ts). Una vez estabilizada se procedió a bombear el hidrolizado.
- Periodo de secado. Durante este periodo se bombeó el hidrolizado para su secado bajo las condiciones fijadas para cada experimento. Se secaron alrededor de 200 mL de hidrolizado por ensayo.
- Periodo de parada. Inmediatamente después de secar los 200 mL de hidrolizado se comenzó a bombear agua de nuevo al sistema. Se desconectó la calefacción con el objetivo de producir un paulatino descenso en las temperaturas. El caudal de agua se redujo gradualmente hasta llegar a cero. Una vez que la temperatura de salida del aire fue inferior a 70 °C se desconectó el flujo de aire y se recogió el producto seco.

Después de cada secado se llevó a cabo una etapa de limpieza en la que se eliminaron los restos de producto adheridos al equipo. La cámara de secado, el ciclón y el atomizador deben quedar perfectamente limpios antes del siguiente secado.

El contenido en sólidos del hidrolizado inicial así como la humedad de las muestras secas se determinó mediante una balanza infrarrojo AD-4714A (A and D, Tokyo, Japón). Cada muestra se midió por triplicado.

4.10. PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO Y ESTADÍSTICOS

4.10.1. Superficies de Respuesta

Las Superficies de Respuesta consisten en una serie de técnicas matemáticas y estadísticas empleadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés, denominada variable de respuesta o de salida, es influenciada por otras variables conocidas como factores o variables de entrada. El objetivo es determinar el óptimo, ya sea local o absoluto, dentro del rango estudiado de las variables experimentales.

La variable de salida (Y) debe ser medible experimentalmente. Como hemos dicho antes esta variable depende de las de entrada, de modo que se puede establecer:

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (4.18)$$

De acuerdo con lo anterior, la función de respuesta se puede presentar como una ecuación polinomial que contenga los distintos factores. Generalmente dicho polinomio será de primer (4.19) o segundo (4.20) grado, representando la ecuación de un plano o una superficie curva respetivamente.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i \neq j}^N \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.19)$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i \neq j}^N \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} X_i^2 \quad (4.20)$$

Una vez que se obtienen los valores de los parámetros $\beta_0 \dots \beta_{NN}$ por regresión múltiple se puede estimar el vector (x_1, \dots, x_n) que hace óptimo (máximo o mínimo) el valor de la variable de salida Y. Para ello se resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales siguiente:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y}{\partial x_1} = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial x_2} = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{\partial Y}{\partial x_N} = 0 \end{array} \right\} \quad (4.21)$$

Además, para el estudio de las superficies de respuesta en 3 dimensiones se emplean las gráficas de contornos. Éstas facilitan la visualización debido a que se grafican únicamente 2 factores y cada curva representa un valor específico de la altura de la superficie, es decir un valor constante de la variable de respuesta.

Por otro lado, a cada modelo se le realiza un análisis de la varianza, estableciendo un nivel de confianza del 95 %, en el que se estudia entre otros, la importancia de cada uno de los factores, sus interacciones y la bondad del modelo ajustado.

Para la realización de todos estos cálculos se empleó el software Statgraphics Centurion XV.11 junto con Microsoft Excel 2010.

4.10.2. Optimización biobjetivo

En muchas ocasiones la optimización de un solo objetivo no basta para mejorar globalmente un proceso. La optimización multiobjetivo se plantea cuando es necesaria la optimización de varios objetivos que planteen un conflicto entre sí. Concretamente en este trabajo se propone la optimización biobjetivo del grado de hidrólisis y la actividad inhibidora de los hidrolizados.

En general, en una optimización multiobjetivo, el propósito a alcanzar sería maximizar o minimizar una función $F(X)$ que es una combinación lineal de varias funciones de respuesta $f(X)$. Estas $f(X)$ son objetivos individuales que dependen de unos determinados factores (x_1, \dots, x_n) y que se desean optimizar simultáneamente.

$$F(X) = [f_1(x_1, \dots, x_n), f_2(x_1, \dots, x_n), \dots, f_m(x_1, \dots, x_n)] \quad (4.22)$$

Las variables de entrada o factores de los que depende cada una de las funciones de respuesta están sometidas a restricciones de tipo técnico de modo que los valores que pueden tomar estos factores pertenecen a un conjunto acotado.

$$x_{i,\min} \leq x_i \leq x_{i,\max} \quad (4.23)$$

El espacio formado por las variables independientes $X (x_1, \dots, x_n)$ se denomina espacio de decisión, puesto que mediante combinaciones de éstas obtendremos los distintos valores óptimos. Dados dos puntos cualesquiera $X1(x_1, \dots, x_n)$ y $X2(x_1, \dots, x_n)$, dentro del espacio de decisión podemos encontrar:

- Que una solución ($X1$) domine sobre otra ($X2$), es decir $X1$ genere mejores valores en todos los objetivos individuales que $X2$.
- Una solución ($X1$) no domina sobre otra ($X2$), si al menos uno de los objetivos individuales alcanzados con $X1$ es peor al obtenido con $X2$.

Un punto del espacio de decisión (X_i) es un óptimo de Pareto si no existe otro punto que mejore alguno de los objetivos obtenidos con X_i sin empeorar de forma simultánea alguno de los otros objetivos individuales. En general, la solución en el sentido de Pareto al problema de optimización multiobjetivo no será única: la solución estará formada por el conjunto de todos los valores no dominados, a los que se conoce como frente de Pareto. En él, ninguna solución es mejor que las demás si atendemos a todos y cada uno de los objetivos individuales.

El método utilizado para obtener el conjunto de soluciones no dominantes o no inferiores es el método de las sumas ponderadas (WSM – Weighted-Sum Method) (Kim & Weck, 2005), en el

que la función objetivo es expresada como combinación lineal de las variables dependientes f_1 y f_2 .

$$F(X) = \alpha \cdot f_1(X) + (1 - \alpha) \cdot f_2(X) \quad (4.24)$$

Donde α representa el factor de ponderación ($0 \leq \alpha \leq 1$) que cuantifica la importancia relativa de alcanzar el objetivo individual. Es decir, para $\alpha = 1$, el problema de optimización se simplificaría convirtiéndose en la optimización individual de f_1 .

Por tanto, el problema de optimización biobjetivo consiste en determinar los valores de las variables de entrada (X) pertenecientes al espacio de decisión que maximizan el valor de la función objetivo para un valor determinado de α . El frente de Pareto se conforma con el conjunto de soluciones que maximizan la función objetivo para cada valor de α . La selección de una única solución óptima entre el set de soluciones no dominantes se podría realizar eventualmente basándose en criterios técnicos, económicos o de seguridad.

Para la realización de la optimización biobjetivo se empleó el software Microsoft Excel 2010.

4.10.3. Comparación de muestras

Para comprobar si los tratamientos (digestión *in vitro* o secado por atomización) tienen un efecto sobre la actividad inhibidora de los hidrolizados, se comparó la muestra original y la sometidas a tratamientos mediante un análisis simple de la varianza (One-way ANOVA). Valores de p-valor inferiores a 0.05 indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

En el caso de que existan diferencias significativas en la actividad inhibidora para el global de las muestras analizadas, se puede determinar si el efecto sobre la actividad inhibidora producido por un tratamiento concreto es significativo o no. Para ello los datos experimentales se analizaron mediante el procedimiento de la diferencia menos significativa de Fisher (LSD), que consiste en comparar parejas de valores medios, permitiendo identificar si dos medias son estadísticamente diferentes a un nivel de confianza del 95 %.

Para realizar estos análisis se utilizó el software Statgraphics Centurion XV.II (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA) y Microsoft Excel 2010.

5. Optimización de la hidrólisis enzimática de leche de cabra

5.1.1. Planteamiento

La hidrólisis enzimática es uno de los procesos que pueden dar lugar a péptidos inhibidores de ACE, como se detalló en la "Introducción", la leche de cabra ha mostrado ser una buena fuente de estos compuestos. Por otra parte, los péptidos inhibidores de ACE suelen presentar tamaños moleculares pequeños, para lograr este tipo de péptidos se necesitan grados de hidrólisis elevados. Por tanto, el grado de hidrólisis es una de las propiedades del hidrolizado que se debe controlar. El objetivo de este capítulo es estudiar el proceso de hidrólisis de leche de cabra con 2 enzimas: subtilisina y tripsina. Para ello, se determinará cómo afectan los parámetros de operación, temperatura de reacción (T) y relación enzima sustrato (ES), sobre el grado de hidrólisis (DH) y la actividad inhibidora de ACE (ACEI). Se obtendrán los modelos matemáticos que ajusten estas relaciones y se procederá a optimizar individualmente cada una de las variables de salida para cada enzima. Por último, y debido a la incompatibilidad de los óptimos encontrados se realizará una optimización biobjetivo con el fin de llegar a una solución de compromiso.

5.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El efecto de las variables de entrada, T y ES, sobre las variables de salida DH y ACEI han sido estudiadas para cada enzima con un diseño factorial 5x6 y mediante superficies de respuesta (RSM). Los niveles de T han sido elegidos de acuerdo a la estabilidad térmica de las enzimas: 45, 50, 55, 60, 65 y 70 °C para subtilisina y 30, 35, 40, 45, 50 y 55 °C para tripsina. Mientras que los niveles ensayados en el caso de ES han sido 1, 2, 3, 4 y 5 % para ambas enzimas.

Las hidrólisis se han llevado a cabo con el dispositivo experimental A (descrito en apartado 4.3), un reactor encamisado de 250 mL, durante un tiempo de reacción de 2.5 h. La medida de la actividad inhibidora de ACE se ha realizado mediante el ensayo espectrofotométrico descrito en el apartado 4.4.1. En esta ocasión se ha empleado para el análisis una dilución 1:10 de las muestras originales con el fin de evitar obtener valores de absorbancia demasiado elevados que generarían medidas no lineales.

Las variables de salida (Y) se han relacionado con las de entrada mediante un polinomio de segundo orden:

$$Y = b_0 + b_1 \cdot T + b_2 \cdot ES + b_{11} \cdot T^2 + b_{12} \cdot T \cdot ES + b_{22} \cdot ES^2 \quad (5.1)$$

Mediante un análisis ANOVA se ha podido determinar la relevancia estadística de cada uno de los coeficientes, asociando un p valor a cada uno de ellos. Para un nivel de confianza del 95 %, los términos con p -valores inferiores a 0.05 tendrían una influencia significativa en la variable de salida. El modelo ajustado mediante RSM ha permitido la optimización de las variables de salida, mediante la determinación de las variables de entrada que maximizan las variables de salida.

Por último, se ha planteado una optimización biobjetivo para cada una de las enzimas ensayadas. Para ello se ha escogido el método de la suma ponderada (véase apartado 4.10.2), en el que se define una función objetivo (OBJ) que es la combinación lineal de las variables de salida (DH y ACEI):

$$OBJ = \alpha \cdot DH + (1 - \alpha) \cdot ACEI \quad (5.2)$$

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han llevado a cabo un total de 30 experimentos para cada enzima, los resultados de DH y ACEI tras 2.5 h de hidrólisis pueden verse en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Diseño experimental y variables de salida medidas (valores en tanto por uno).

SUBTILISINA				TRIPSINA			
T, °C	ES, %	DH	ACEI	T, °C	ES, %	DH	ACEI
45	1	0.156	0.296	30	1	0.094	0.355
45	2	0.178	0.291	30	2	0.109	0.378
45	3	0.182	0.281	30	3	0.122	0.341
45	4	0.193	0.333	30	4	0.128	0.309
45	5	0.204	0.284	30	5	0.136	0.294
50	1	0.170	0.290	35	1	0.104	0.371
50	2	0.185	0.336	35	2	0.130	0.395
50	3	0.198	0.347	35	3	0.126	0.367
50	4	0.200	0.327	35	4	0.133	0.263
50	5	0.204	0.338	35	5	0.136	0.287
55	1	0.171	0.316	40	1	0.108	0.364
55	2	0.192	0.297	40	2	0.123	0.325
55	3	0.199	0.316	40	3	0.133	0.280
55	4	0.204	0.314	40	4	0.136	0.276
55	5	0.218	0.327	40	5	0.146	0.317
60	1	0.181	0.322	45	1	0.120	0.319
60	2	0.198	0.307	45	2	0.134	0.274
60	3	0.206	0.285	45	3	0.145	0.254
60	4	0.213	0.307	45	4	0.153	0.276
60	5	0.223	0.294	45	5	0.158	0.241
65	1	0.178	0.318	50	1	0.127	0.334
65	2	0.194	0.306	50	2	0.141	0.270
65	3	0.201	0.309	50	3	0.148	0.240
65	4	0.210	0.306	50	4	0.156	0.270
65	5	0.215	0.303	50	5	0.159	0.273
70	1	0.175	0.265	55	1	0.130	0.326
70	2	0.187	0.255	55	2	0.142	0.313
70	3	0.200	0.251	55	3	0.145	0.260
70	4	0.203	0.253	55	4	0.152	0.227
70	5	0.212	0.250	55	5	0.159	0.270

5.3.1. Grado de hidrólisis

Para cada uno de los experimentos planteados se obtuvo la curva de hidrólisis en la que se representa cómo varió DH a lo largo de la reacción. Las curvas de hidrólisis obtenidas para cada temperatura ensayada con subtilisina se representan en las Figura 5.1 - Figura 5.6, mientras que las obtenidas para tripsina pueden observarse entre la Figura 5.7 - Figura 5.12. Todas estas curvas describen la típica forma de las curvas de hidrólisis, con un periodo inicial de velocidad de reacción constante (zona lineal) en el que se produce un incremento muy acentuado del grado de hidrólisis. Posteriormente la velocidad va disminuyendo a medida que disminuye la concentración de sustrato.

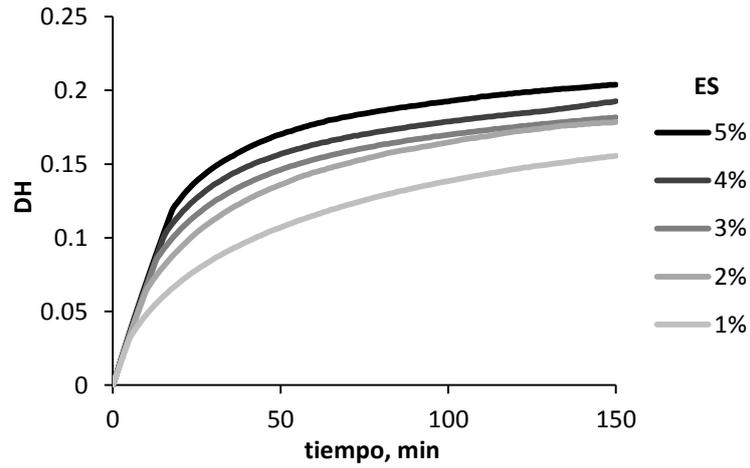


Figura 5.1. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 45 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

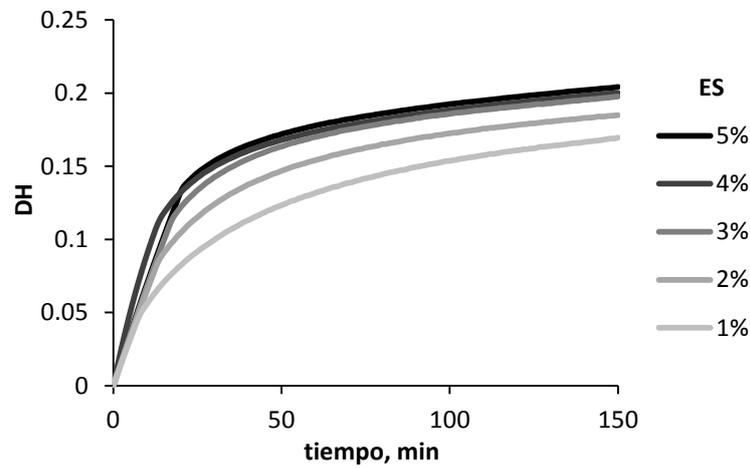


Figura 5.2. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 50 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

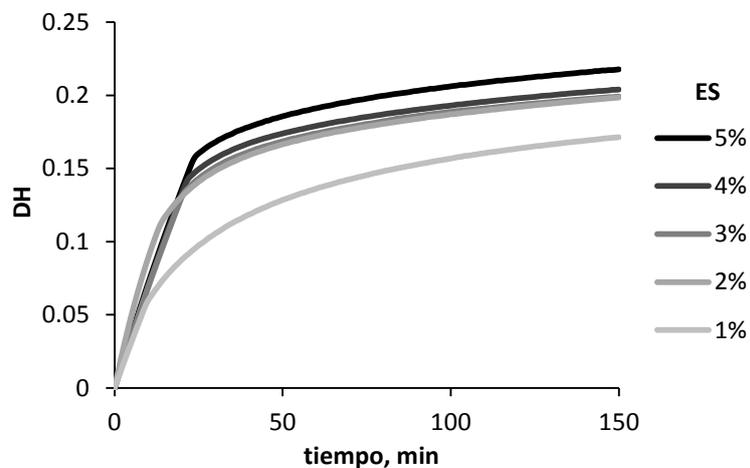


Figura 5.3. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 55 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

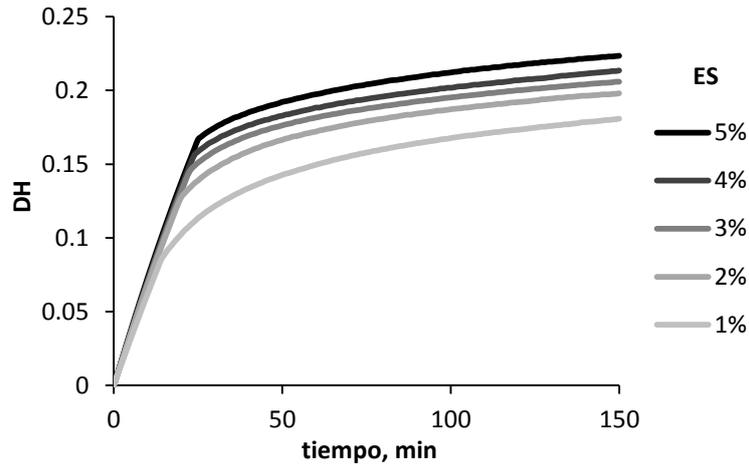


Figura 5.4. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 60 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

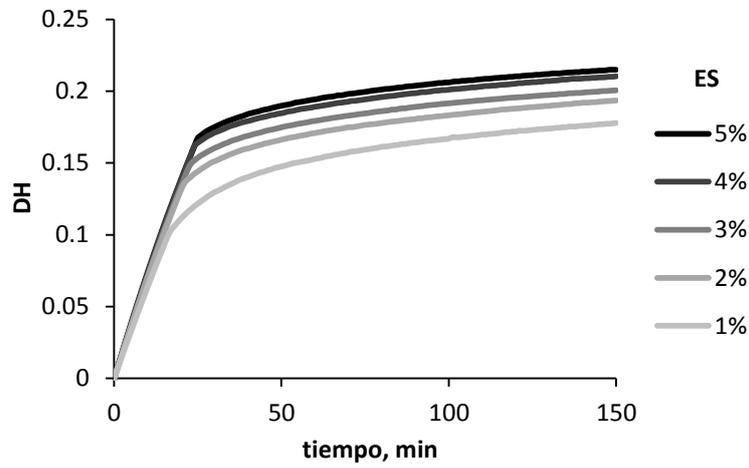


Figura 5.5. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 65 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

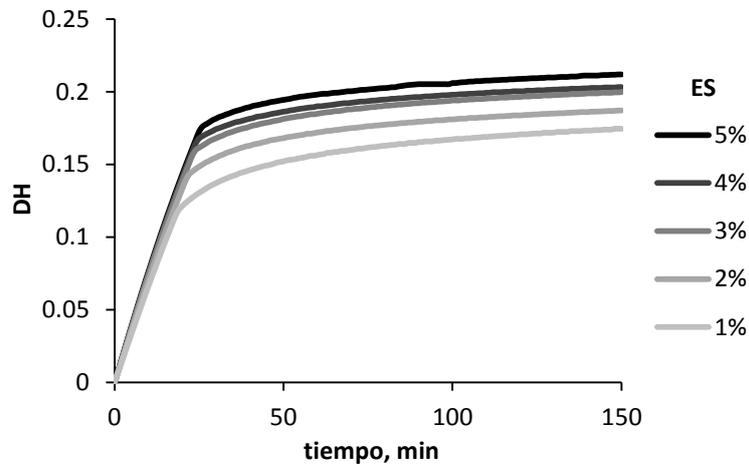


Figura 5.6. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con subtilisina a 70 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

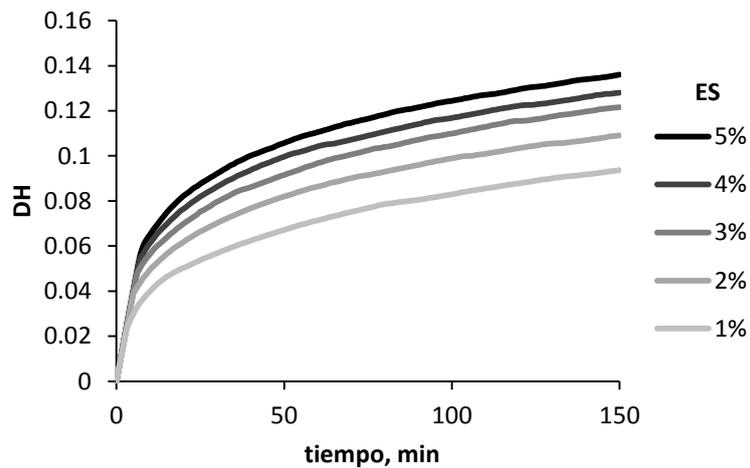


Figura 5.7. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 30 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

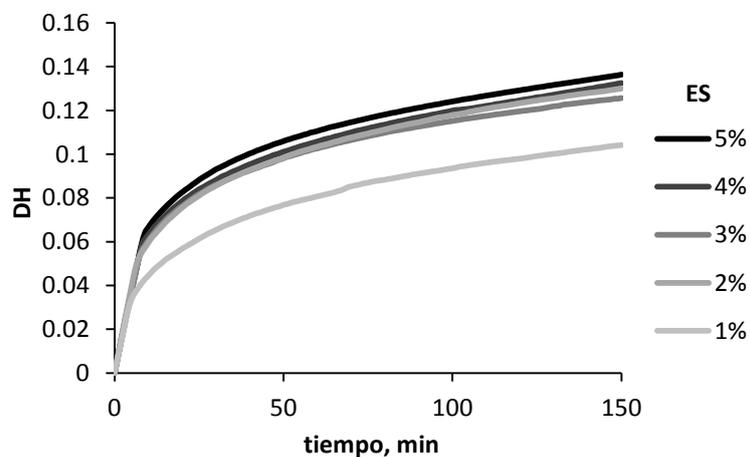


Figura 5.8. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 35 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

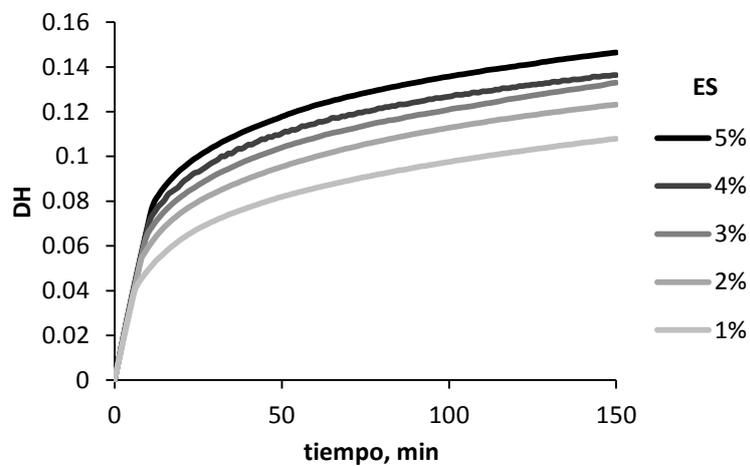


Figura 5.9. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 40 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

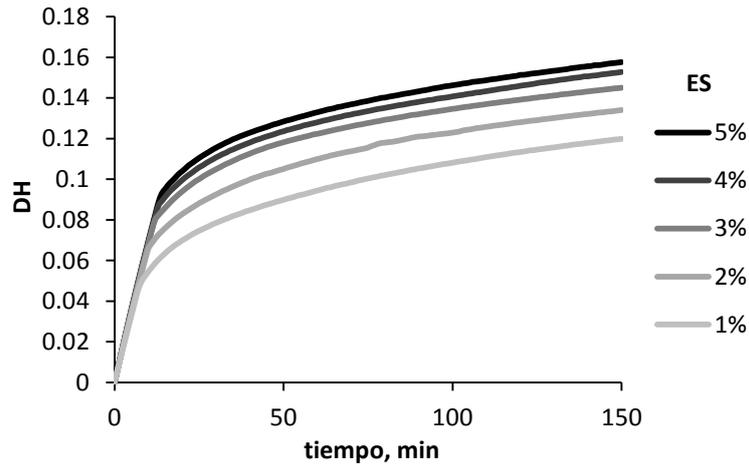


Figura 5.10. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 45 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

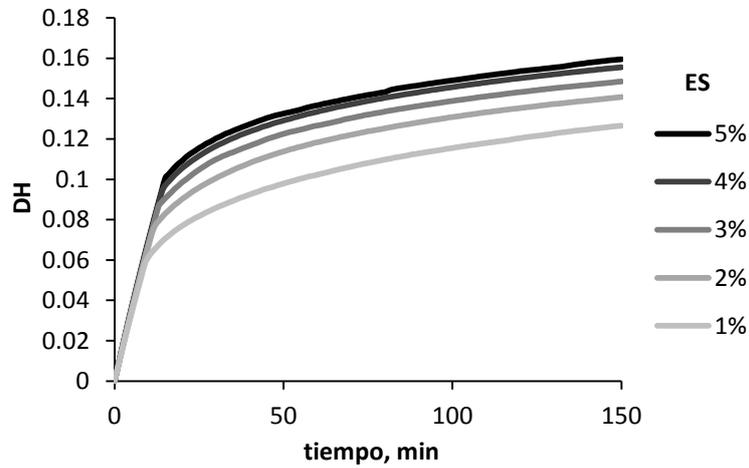


Figura 5.11. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 50 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

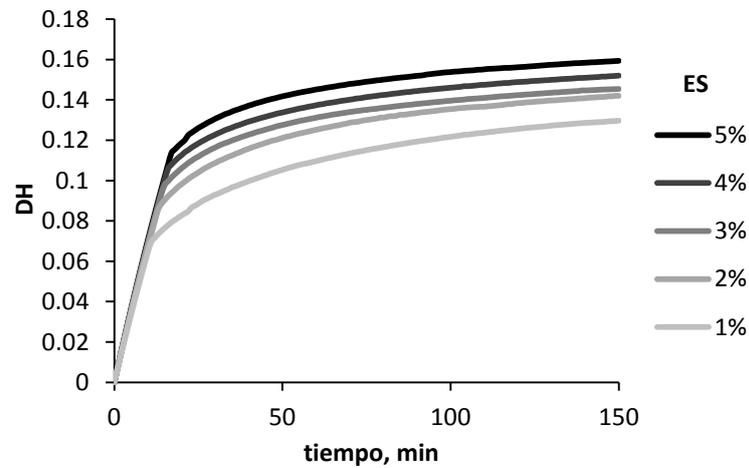


Figura 5.12. Curvas de hidrólisis para la hidrólisis con tripsina a 55 °C y distintas relaciones enzima/sustrato.

Los grados de hidrólisis finales obtenidos (Tabla 5.1) variaron entre 0.155 y 0.223 para subtilisina y entre 0.0936 y 0.159 en el caso de tripsina. Como puede verse, los valores finales de DH obtenidos con tripsina fueron inferiores a los de subtilisina, esto puede atribuirse a su menor capacidad hidrolítica (sólo ataca a dos tipos de enlaces peptídicos). Además puede observarse que cuanto mayor fue ES, mayor fue el DH obtenido.

Para establecer un modelo que relacione DH con los factores ensayados (T y ES), los datos experimentales se ajustaron a un polinomio de segundo orden. Las ecuaciones resultantes para subtilisina (5.3) y para tripsina (5.4) son:

$$DH = -0.130862 + 0.00948341 \cdot T + 0.0207456 \cdot ES - 0.0000764304 \cdot T^2 - 0.0000474746 \cdot T \cdot ES - 0.0013855 \cdot ES^2 \quad (5.3)$$

$$DH = -0.0114855 + 0.00386439 \cdot T + 0.020085 \cdot ES - 0.0000285231 \cdot T^2 - 0.0000726439 \cdot T \cdot ES - 0.00143005 \cdot ES^2 \quad (5.4)$$

Para cada uno de estos ajustes, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.2. Considerando un nivel de confianza del 95 %, para ambas enzimas, DH se vió afectado tanto por T como por ES debido a que el p-valor asociado a los términos lineales y cuadráticos de las variables de entrada fueron menores de 0.05. Sin embargo, el término de interacción (T•ES) no ejerció un efecto significativo sobre DH para ninguna de las enzimas.

Tabla 5.2. Análisis ANOVA para DH de las hidrólisis con subtilisina y tripsina.

	Subtilisina ¹			Tripsina ²		
	Coefficiente	Suma de cuadrados	p-valor	Coefficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	-1.31E-01			-1.15E-02		
T	9.48E-03	6.65E-04	<0.001	3.86E-03	3.27E-03	<0.001
ES	2.07E-02	5.65E-03	<0.001	2.01E-02	4.25E-03	<0.001
T ²	-7.64E-05	6.82E-04	<0.001	-2.85E-05	9.49E-05	0.027
T•ES	-4.75E-05	9.86E-06	0.361	-7.26E-05	2.31E-05	0.256
ES ²	-1.39E-03	1.61E-04	0.001	-1.43E-03	1.72E-04	0.004
Modelo		7.17E-03	<0.001		7.81E-03	<0.001
Residuos		2.73E-04			4.08E-04	
Total		7.44E-03			8.22E-03	

¹R² = 0.963; Error estándar de estimación = 0.003; Media de error absoluto = 0.002

²R² = 0.950; Error estándar de estimación = 0.004; Media de error absoluto = 0.003

La relevancia del modelo completo se evaluó mediante su p-valor, que resultó ser menor de 0.001 para ambas enzimas. Conjuntamente, el coeficiente de determinación (R^2) proporciona una medida de la proporción de variación observada en DH que puede explicar el modelo propuesto. Como se puede ver en la nota al pie de Tabla 5.2, los valores obtenidos para este coeficiente fueron 0.9634 para subtilisina y 0.9503 para tripsina, lo que demuestra que el modelo obtenido ajustó los datos adecuadamente. En la Tabla 5.2 también se proporciona información sobre los residuos (diferencias entre valores observados y calculados). Estos errores se distribuyen alrededor de un valor medio (media del error absoluto) y presentan una desviación estándar (error estándar de estimación) que es indicativa del grado de ajuste del modelo.

Además del estudio ANOVA, en la Figura 5.13 se representan, para cada enzima, los valores de DH calculados con el modelo propuesto (valores predichos) frente a las medidas experimentales. Los puntos se ajustan a una línea recta mediante regresión lineal, de forma que el grado de coincidencia existente entre la recta de ajuste y la diagonal indicaría la bondad del ajuste del modelo polinomial. En estas gráficas (Figura 5.13) también se representan dos líneas de puntos de color gris a ambos lados de la diagonal que representan una desviación de $\pm 10\%$ respecto de la misma. Como se observa en estas figuras, todos los puntos se encuentran dentro de estas líneas discontinuas y alineadas con la diagonal, la desviación del modelo es, por tanto, pequeña.

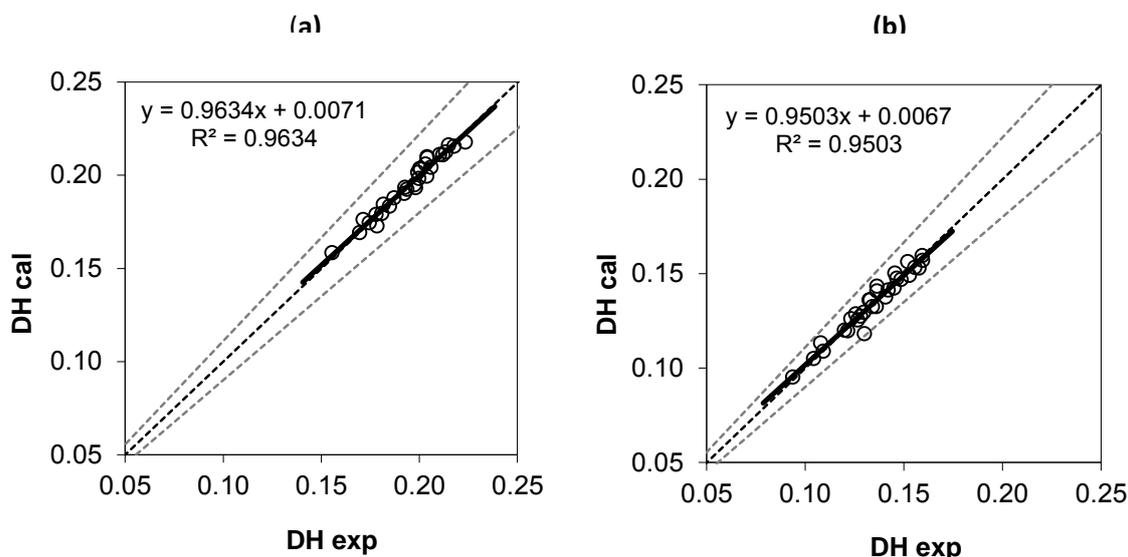


Figura 5.13. Valores de grado de hidrólisis calculados y experimentales para subtilisina (a) y tripsina (b).

Como se ha comprobado, los modelos calculados para DH tanto para subtilisina como para tripsina ajustaron bien los datos experimentales. La influencia de cada una de las variables de entrada puede observarse en la Figura 5.14, donde se representan los valores de DH en función de T y de ES. Para subtilisina los valores de DH alcanzaron un óptimo dentro del intervalo de temperaturas ensayadas. Este óptimo puede observarse para cada uno de los valores de ES. Sin embargo, para tripsina el máximo valor de DH obtenido se alcanzó a la temperatura más alta ensayada. Respecto a la variación de DH con ES se observa un comportamiento similar para ambas enzimas, alcanzándose los mayores valores de DH a mayores ES.

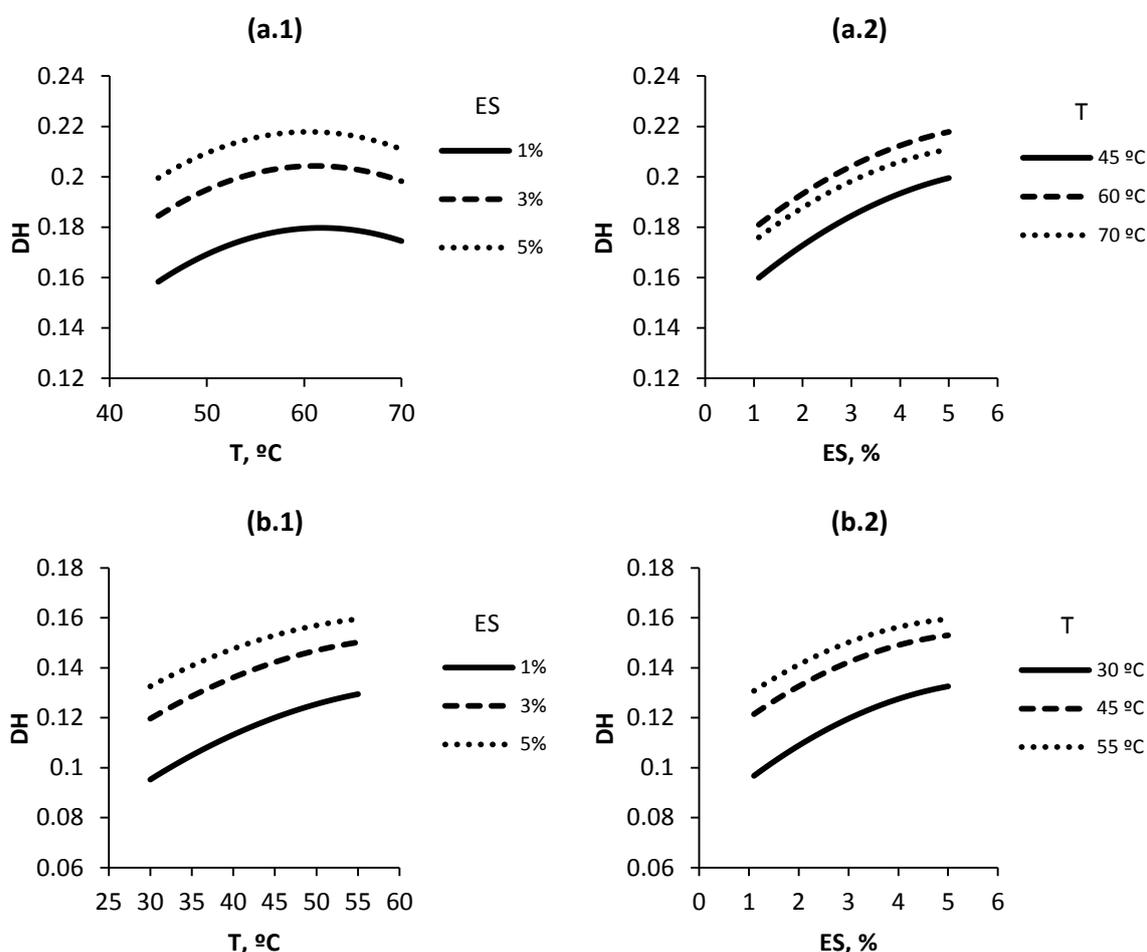


Figura 5.14. Variación de DH para subtilisina (a) y tripsina (b) en función de T (1) y ES (2).

En los gráficos de contornos (Figura 5.15) los niveles de la variable de salida (DH) se representan en función de las variables de entrada (T y ES). Al igual que en la Figura 5.14(a.2) y la Figura 5.14(b.2), los gráficos de contorno muestran que altos valores de ES generaron hidrolizados con elevados valores de DH (esto se cumple para todas las temperaturas). Un resultado esperado debido a que al aumentar la concentración de enzima, aumenta el número de centros activos disponibles y como consecuencia el sustrato es atacado más rápidamente.

Por tanto, a un valor del 5 % de ES (el máximo nivel ensayado) se encontraría el óptimo para ambas enzimas. Con respecto a la temperatura, para subtilisina se identificó un máximo de DH a 60.5 °C (Figura 5.15a), lo que indica que temperaturas superiores provocarían una desactivación enzimática que impediría mejorar DH. Para tripsina (Figura 5.15b), sin embargo, no fue posible identificar el óptimo de temperatura dentro del rango experimental, el mejor valor de temperatura encontrado coincidió con el mayor valor de T ensayado (55 °C), lo que indica que la desactivación térmica no sería relevante. En resumen, los máximos determinados para el grado de hidrólisis fueron 0.218 para subtilisina y 0.159 para tripsina.

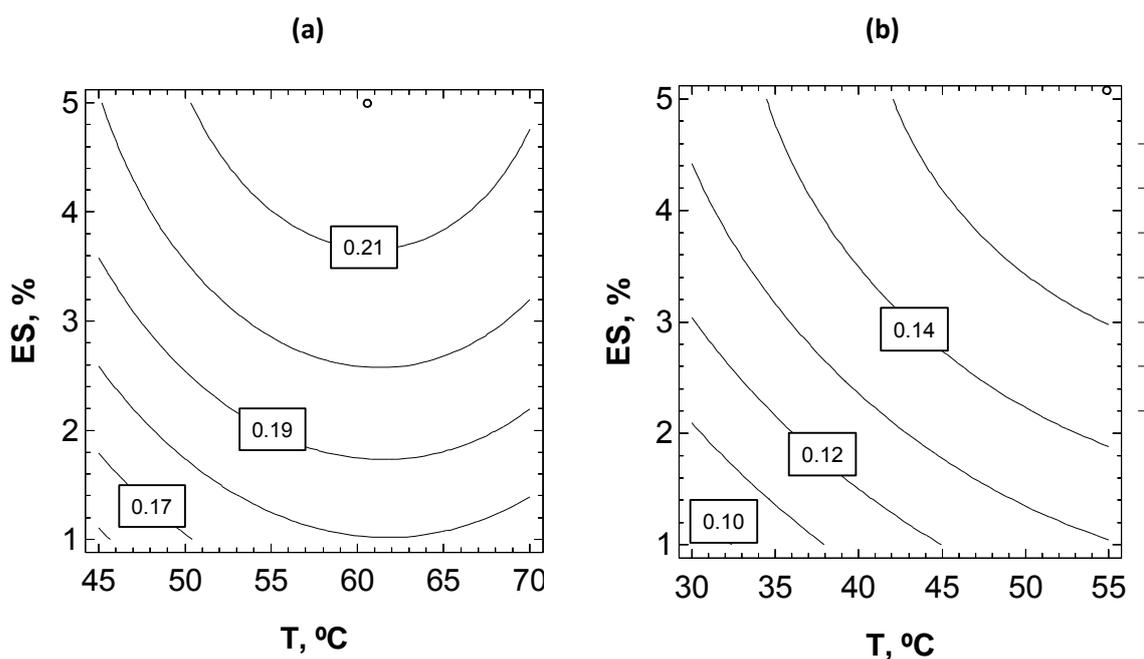


Figura 5.15. Gráficos de contorno de DH para subtilisina (a) y tripsina (b).

5.3.2. Actividad inhibidora de ACE

Como se puede ver en la tabla de resultados (Tabla 5.1), los valores de ACEI (en tanto por uno) obtenidos oscilaron entre 0.250 y 0.347 para subtilisina y entre 0.227 y 0.395 para tripsina. De igual forma que para DH, los datos experimentales se ajustaron a un modelo cuadrático relacionando las variables de entrada (T y ES) con ACEI, obteniéndose las siguientes ecuaciones de ajuste para subtilisina (5.5) y tripsina (5.6).

$$ACEI = -0.474512 + 0.0279707 \cdot T + 0.0232398 \cdot ES - 0.000246967 \cdot T^2 - 0.000391206 \cdot T \cdot ES - 0.0000582342 \cdot ES^2 \quad (5.5)$$

$$ACEI = 0.699206 - 0.0109427 \cdot T - 0.0618087 \cdot ES + 0.0000853372 \cdot T^2 + 0.00027879 \cdot T \cdot ES + 0.00524259 \cdot ES^2 \quad (5.6)$$

El análisis ANOVA realizado (Tabla 5.3) reveló que cuando se utilizó subtilisina sólo los términos lineal y cuadrático de T influyeron significativamente en la actividad inhibidora con un nivel de confianza del 95 %. En el caso de tripsina, sólo T y ES resultaron significativos con un efecto negativo sobre ACEI. La bondad del ajuste de estos modelos fue inferior al obtenido para DH. De hecho, teniendo en cuenta el coeficiente de determinación (R^2), el modelo ajustado de ACEI para subtilisina explicaría el 64.8 % de la variabilidad de los datos experimentales mientras que para el de tripsina explicaría el 69.4 %.

Tabla 5.3. Análisis ANOVA para ACEI de las hidrólisis con subtilisina y tripsina.

	Subtilisina ¹			Tripsina ²		
	Coefficiente	Suma de cuadrados	p-valor	Coefficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	-4.75E-01			6.99E-01		
T	2.80E-02	5.63E-03	<0.001	-1.09E-02	1.78E-02	<0.001
ES	2.32E-02	9.41E-06	0.862	-6.18E-02	2.05E-02	<0.001
T ²	-2.47E-04	7.12E-03	<0.001	8.53E-05	8.50E-04	0.301
T·ES	-3.91E-04	6.70E-04	0.150	2.79E-04	3.40E-04	0.510
ES ²	-5.82E-05	2.85E-07	0.976	5.24E-03	2.31E-03	0.095
Modelo		1.34E-02	<0.001		4.18E-02	<0.001
Residuos		7.27E-03			1.83E-02	
Total		2.07E-02			6.01E-02	

¹ $R^2 = 0.648$; Error estándar de estimación = 0.017; Media de error absoluto = 0.013

² $R^2 = 0.696$; Error estándar de estimación = 0.027; Media de error absoluto = 0.020

Esta diferencia en el ajuste puede observarse también en la Figura 5.16, donde la dispersión de los puntos respecto a la diagonal es más amplia que la observada en los modelos de DH. Sin embargo, la mayoría de estos puntos se encuentran dentro de las líneas grises discontinuas que marcan el 10 % de desviación respecto del comportamiento ideal.

La variación de ACEI en función de las variables de entrada puede observarse en la Figura 5.17. Para subtilisina se encontró un valor óptimo de temperatura que maximizaba ACEI para cualquier ES (Figura 5.17-a1-). Sin embargo, para tripsina (Figura 5.17-b.1-) los mejores valores de inhibición se obtuvieron para las temperaturas más bajas ensayadas. Los valores ES parecen afectar de forma diferente al ACEI obtenido con subtilisina dependiendo de la temperatura (Figura 5.17-a2-). Para tripsina, sin embargo, valores de ES bajos favorecieron la actividad inhibidora (Figura 5.17-b.2-).

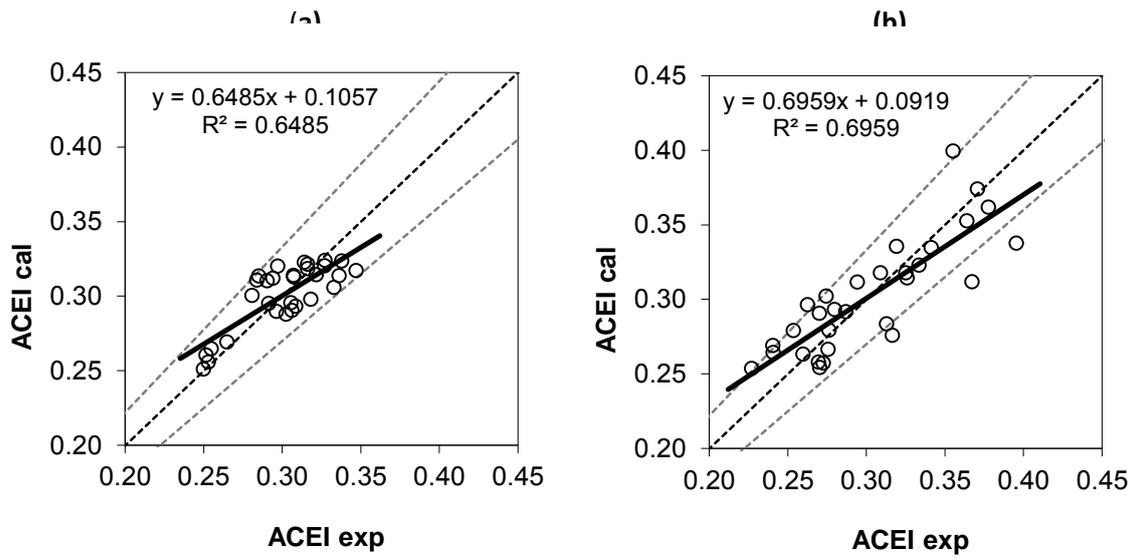


Figura 5.16. Valores de inhibición de ACE calculados y experimentales para subtilisina (a) y tripsina (b).

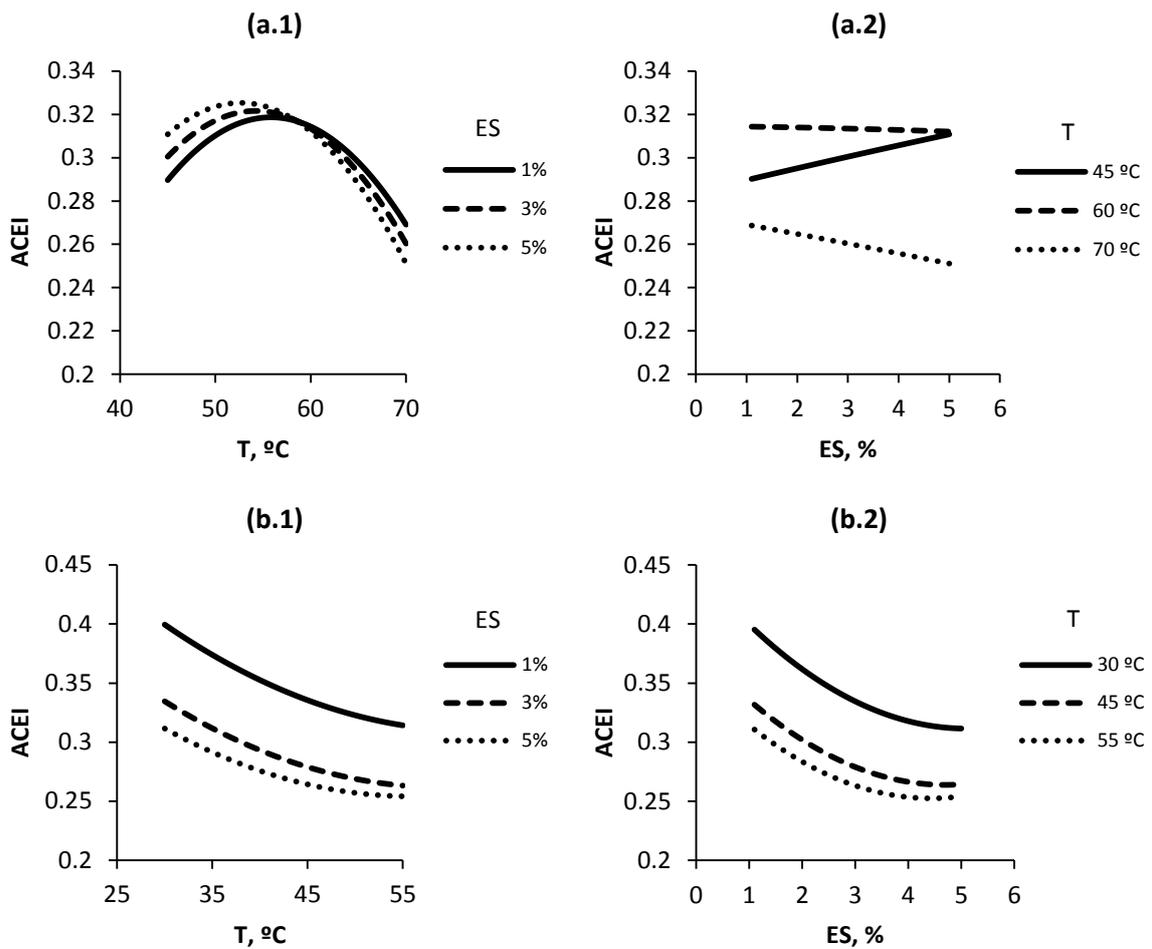


Figura 5.17. Variación de ACEI para subtilisina (a) y tripsina (b) en función de T (1) y ES (2).

Los gráficos de contorno obtenidos para ACEI (Figura 5.18), muestran la influencia de T y ES conjuntamente sobre la actividad inhibitoria de los hidrolizados. En el caso de subtilisina, a bajas temperaturas, ACEI aumentó hasta alcanzar un máximo de 0.325 a 52.7 °C y para una ES = 5 % (nivel más alto ensayado). Mientras que para tripsina se observó que el máximo valor de ACEI (0.399) se encontraba a los niveles más bajos ensayados (T = 30 °C y ES = 1 %). Resultados similares han sido descritos por Var den Ven et al. (2002) para la Corolase PP (una mezcla de enzimas de páncreas porcino que contiene tripsina) y para enzimas presentes en extracto de cardo (Tavares et al., 2011).

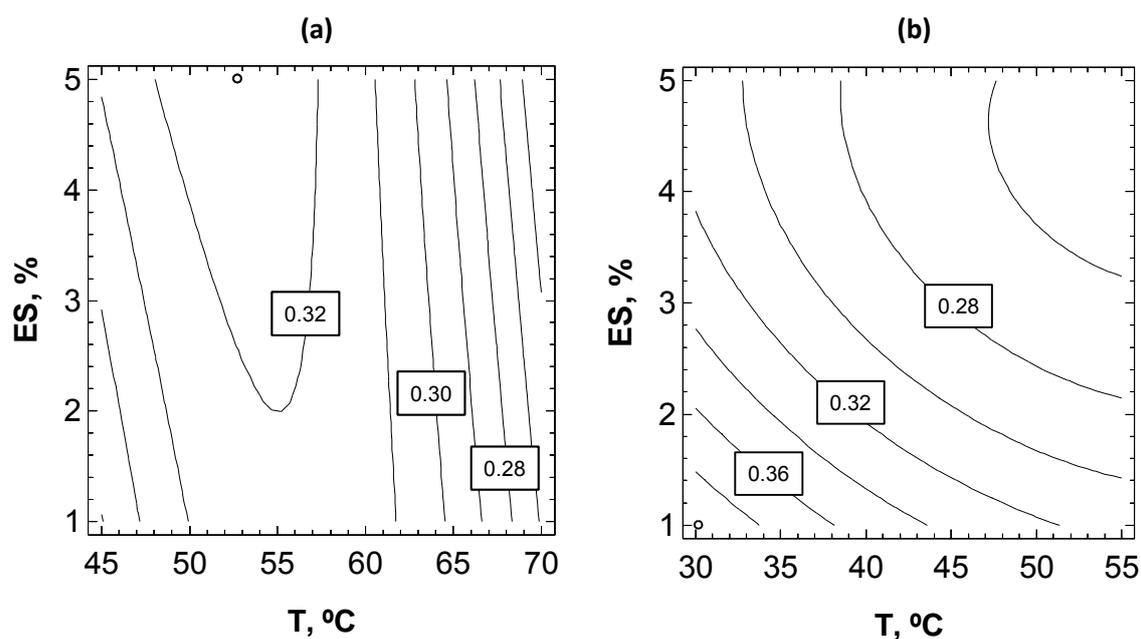


Figura 5.18. Gráficos de contorno de ACEI para subtilisina (a) y tripsina (b).

Para identificar la posible relación entre ambas variables de salida, se realizó un ajuste lineal de ACEI frente a DH (Figura 5.19). En el caso de subtilisina, no se observó ninguna relación ($R^2 = 0.005$). Sin embargo, para la tripsina se obtuvo un R^2 de 0.6132 con una pendiente de -2.1258. El mismo efecto negativo fue determinado por Van der Ven et al. (2002) para el grado de hidrólisis en la hidrólisis de proteínas del lactosuero.

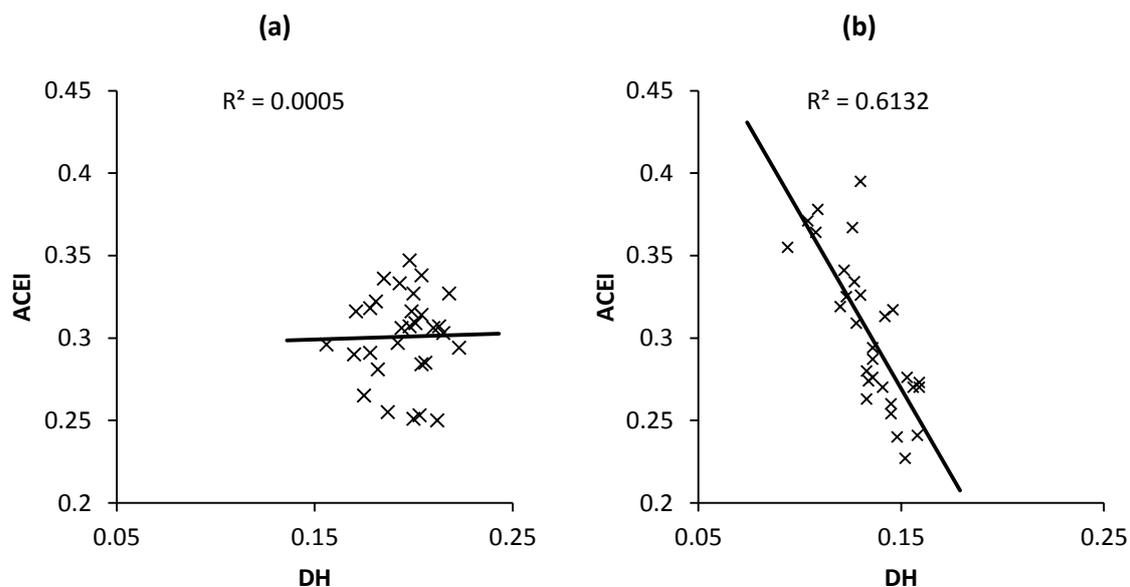


Figura 5.19. Correlación entre ACEI y DH para subtilisina (a) y tripsina (b)

5.3.3. Optimización biobjetivo

En las optimizaciones individuales realizadas previamente, se observa que los óptimos de DH y ACEI se obtuvieron en condiciones distintas. Sin embargo, el objetivo global era obtener hidrolizados con alto DH (para asegurar una alta proporción de péptidos de bajo peso molecular) y al mismo tiempo que posean altos valores de ACEI. Esta discrepancia fue abordada mediante el planteamiento de una optimización biobjetivo con el propósito de obtener un set de soluciones que satisficieran los dos objetivos en un grado adecuado.

Para ello se siguió el método de la suma ponderada, en el que el factor de ponderación (α) toma valores de 0 a 1 de acuerdo con la importancia relativa que se desee asignar a DH frente a ACEI. Es decir, cuanto más cercano esté α a la unidad mayor será la preferencia hacia la optimización de DH, mientras que valores bajos de α favorece la maximización de ACEI. Para cada valor α , se determina una solución no inferior, esto es la combinación de valores de T y ES que maximiza la función objetivo.

Los resultados generados mediante la optimización biobjetivo en la hidrólisis de subtilisina se presentan en la Figura 5.20a, donde los valores óptimos de las variables de entrada (T y ES) son representados en función de α . Como se observa, al aumentar de 0 a 1, el óptimo de T aumentó desde 52.7 a 60.5 °C siguiendo una curvatura convexa. Por otro lado todas las soluciones no inferiores se correspondieron con el valor máximo de ES ensayado (5 %).

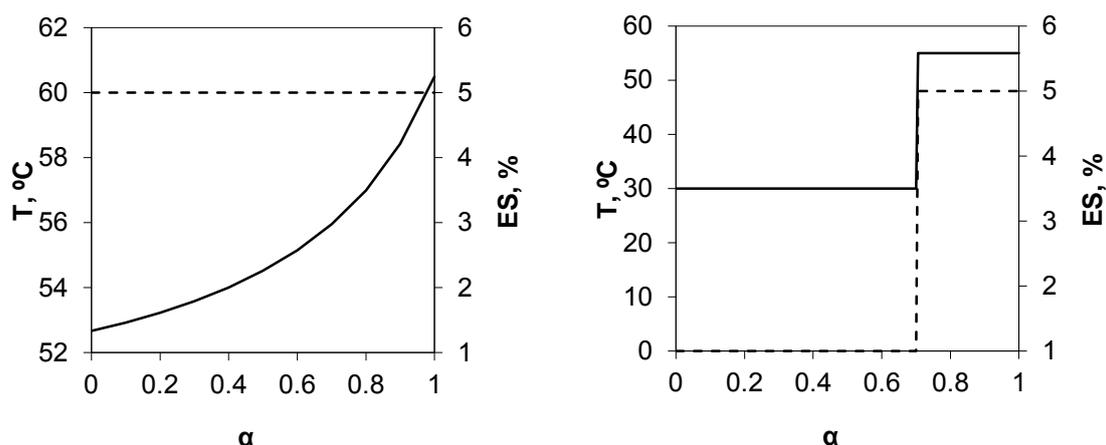


Figura 5.20. Set de valores óptimos de temperatura (línea continua) y relación enzima-sustrato (línea discontinua) para subtilisina (a) y tripsina (b) en función del factor de ponderación.

Los valores de las variables de salida (DH y ACEI) asociadas a la optimización biobjetivo de subtilisina se muestran en la Figura 5.21^a. Esta representación también es conocida como frente de Pareto. Los valores de DH incrementaron su valor continuamente desde 0.213 para $\alpha = 0$, hasta alcanzar un valor máximo de 0.218 para $\alpha = 1$, que coincide con el valor máximo obtenido en la optimización individual de DH. La curva presenta un punto de inflexión en torno a $\alpha = 0.9$ que implica un cambio de convexo a cóncavo. Para ACEI, sin embargo, la curva obtenida desciende desde un máximo de 0.325 para $\alpha = 0$ hasta 0.310 para $\alpha = 1$. Este descenso es mucho más pronunciado para valores de α superiores a 0.6, por lo que dentro del rango $0 < \alpha < 0.6$, el valor de DH podría mejorarse (elevando T hasta 55 °C) manteniendo ACEI en un valor próximo a su máximo (ACEI = 0.324). Por el contrario, el ligero incremento en DH producido en el intervalo $0.6 < \alpha < 1$ significaría un descenso importante de ACEI. Además esta posible mejora de DH iría acompañada de un aumento de T que no sería deseable desde un punto de vista económico.

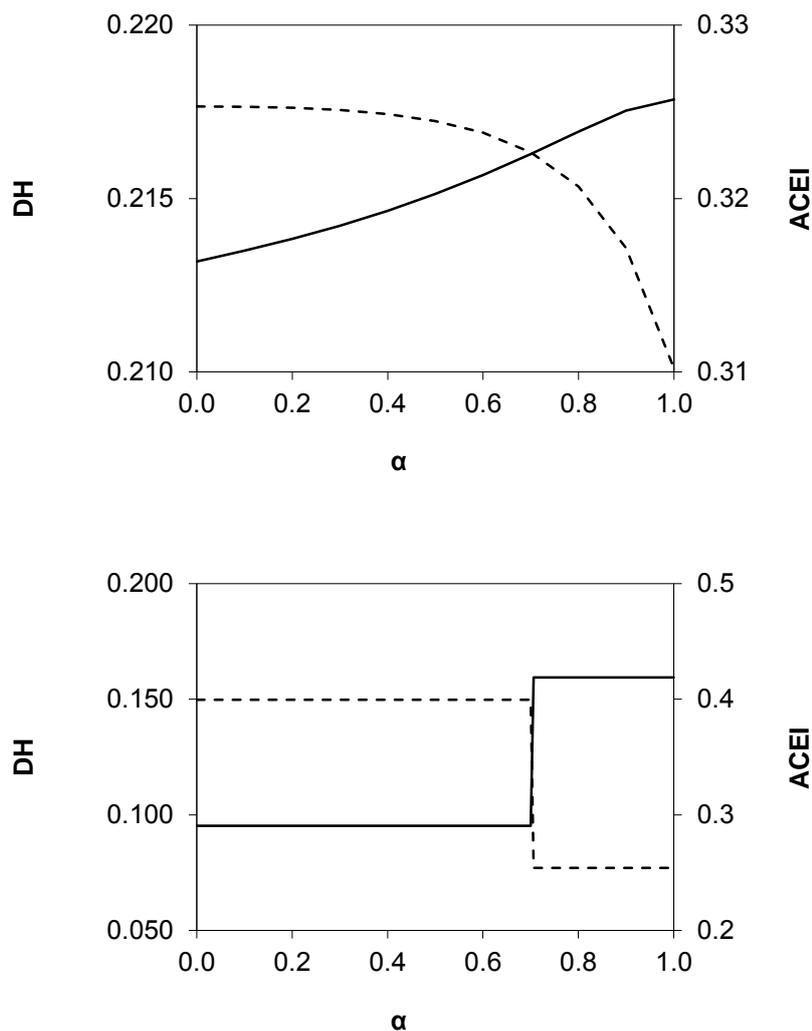


Figura 5.21. Set de valores óptimos para del grado de hidrólisis (línea continua) y para inhibición de ACE (línea discontinua) para subtilisina (a) y tripsina (b) en función del factor de ponderación

Los valores óptimos de T y ES para la optimización biobjetivo de la hidrólisis con tripsina se representan en la Figura 5.20b. Al contrario que para subtilisina, donde se observaba un comportamiento continuo, para tripsina sólo se obtuvieron 2 soluciones óptimas que maximizaban la función objetivo. Para cualquier valor de $\alpha < 0.70$, el problema de optimización convergió a una única solución no-inferior que se corresponde con los menores valores ensayados de T (30 °C) y ES (1 %). Cuando α es superior a 0.70, lo que indicaría mayor preferencia por la optimización de DH, los valores óptimos de T y ES se corresponden con los más altos ensayados (55 °C y 5 %, respectivamente).

Con respecto al frente de Pareto (Figura 5.21b), los valores de DH y ACEI muestran las 2 soluciones óptimas encontradas, separadas por $\alpha = 0.70$. Como se puede ver, para valores de α comprendidos entre 0 y 0.7, DH tomó un valor óptimo de 0.095. Para valores superiores a $\alpha =$

0.7, el valor de DH óptimo fue 0.159. En el caso de ACEI las soluciones óptimas fueron 0.399 ($\alpha < 0.7$) y 0.254 ($\alpha = 0.7$).

Aunque el conjunto de soluciones propuestas mediante este método originan resultados igualmente óptimos, de acuerdo al proceso y a criterios, fundamentalmente de tipo económico, se podría seleccionar un valor concreto para α . En este supuesto, si se trabajara con subtilisina un $\alpha = 0.6$ permitiría obtener un DH (0.21) mayor que el obtenido para α inferiores manteniendo sin embargo una ACEI (0.32) no muy alejada de la más alta obtenida. Para tripsina sólo tendríamos dos posibilidades, debido al ahorro energético que supone trabajar a bajas temperaturas se podría escoger $\alpha=0$ lo que supone trabajar a bajas T y ES, obteniendo bajos DH (0.09) pero altos ACEI (0.40). Ante estos resultados subtilisina parece una mejor opción para la hidrólisis, ya que optimizando T y ES permite generar hidrolizados con altos DH y ACEI simultáneamente.

5.4. CONCLUSIONES

El grado de hidrólisis (DH) y el porcentaje de inhibición de ACE (ACEI) de los hidrolizados de leche de cabra producidos con subtilisina y tripsina han sido optimizados mediante la técnica de superficies de respuesta. Para DH los valores máximos se obtienen para las siguientes condiciones de operación: enzima subtilisina DH=0.218, T=60.5 °C y ES=5 % - enzima tripsina DH=0.159, T=55 °C y ES=5 %. Para ACEI los valores máximos se obtienen para las siguientes condiciones de operación: enzima subtilisina ACEI=0.320, T=52.7 °C y ES=5 % - enzima tripsina ACEI=0.399, T=30 °C y ES=1 %. La optimización conjunta de DH y ACEI genera un pareto de soluciones de compromiso en función del valor de α , que pondera la priorización de DH frente ACEI. Para subtilisina si α aumenta de 0 a 1, la temperatura se incrementa de 52.7 a 60.5 °C, mientras que ES permanece constante al 5%. En el caso de tripsina, para $\alpha < 0.70$, el óptimo se encuentra a 30 °C y 1 %, mientras que para $\alpha > 0.70$, el óptimo está a 55 °C y 5 %.

6. Fraccionamiento de proteínas de leche de cabra con membranas

6.1. PLANTEAMIENTO

Para estudiar el comportamiento de las distintas fracciones proteicas de la leche de cabra frente a la hidrólisis, es necesaria una separación previa de las fracciones de la leche: caseínas y proteínas séricas. De acuerdo con Brans et al., (2004) el tamaño de las caseínas puede variar entre 20-300 nm mientras que las proteínas del lactosuero tienen un tamaño entre 3-6 nm. La tecnología de membranas permite obtener dos fracciones a partir de la leche: una rica en caseína y otra enriquecida en las proteínas del suero. Las membranas más usadas para este fin, son las cerámicas, cuyo tamaño de poro oscila entre 0.05 y 0.2 μm (Pouliot et al., 1996; Punidadas y Rizvi, 1998). Toda la bibliografía encontrada coincide en que la leche se ha de desnatar como paso previo a la filtración. Teniendo en cuenta lo anterior, en esta investigación se empleará un proceso de ultrafiltración por una membrana cerámica de 0.14 μm con un desnatado previo, con el objetivo de retener las caseínas y dejar pasar las proteínas del lactosuero.

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La leche de cabra previamente desnatada mediante centrifugación a 4 °C y 4500 rpm (4845 g) durante 30 min (Sigma Laborzentrifugen 6K15, Osterode am Harz, Alemania) se ha sometido a un proceso de ultrafiltración con una membrana cerámica tubular (TAMI, France) con un tamaño de corte de 0.14 μm . La membrana tiene 1.2 m de longitud, 3 canales y un área de filtración de 0.045 m².

Previo a la filtración, se ha realizado un acondicionamiento de la membrana consistente en circular agua durante 1 h en recirculación total y en las mismas condiciones de temperatura (50 °C), velocidad de circulación (3.3 m/s) y ΔP (1 bar) de la filtración. La leche desnatada se ha calentado a 50 °C antes de la filtración, manteniéndose a esa temperatura durante todo el proceso. La filtración se ha llevado a cabo con un caudal de 400 L/h (3.3 m/s) y una presión transmembrana de 1 bar. Se ha operado en modo de concentración, siguiendo la evolución del flujo de filtrado con el tiempo hasta alcanzar un factor de concentración de 3. Al final del proceso, con el fin de recuperar todo el sustrato, el líquido remanente en el circuito se ha recogido y juntado con el retenido. Las fracciones obtenidas han sido conservadas a 4 °C (no más de 4 días) hasta su hidrólisis.

Una vez terminada la filtración, la membrana se ha limpiado siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.2.4 evaluándose la recuperación de la membrana después de la limpieza.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 6.1 se muestra la evolución del flujo de filtrado a lo largo de la etapa de concentración. El flujo disminuyó desde $22.68 \cdot 10^{-3} \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ hasta $6.80 \cdot 10^{-3} \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ debido al ensuciamiento progresivo de la membrana, lo que supone una pérdida de flujo cercana al 70 %. El flujo disminuyó continuamente durante el proceso, no alcanzándose un valor estacionario en las 2 h que se emplearon para alcanzar un factor de concentración 3.

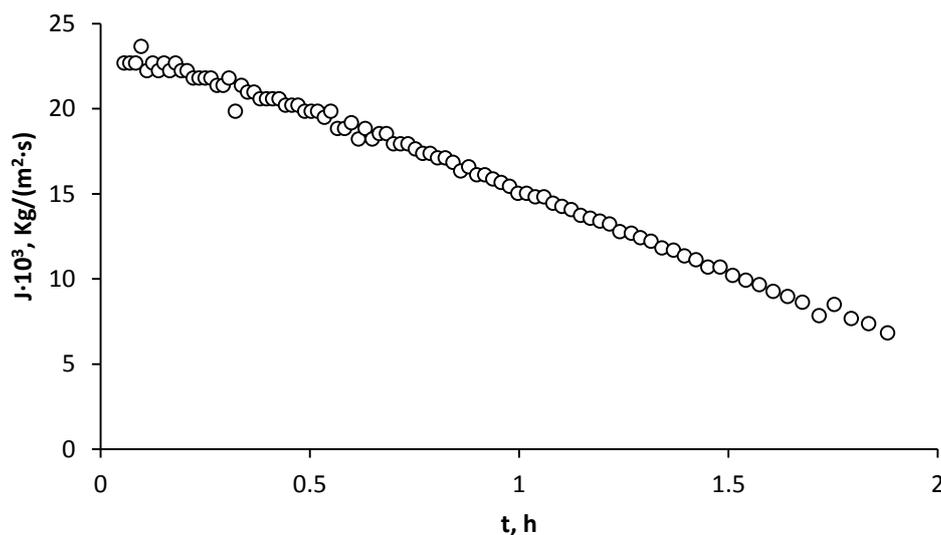


Figura 6.1. Evolución del flujo de filtrado para la membrana de $0.14 \mu\text{m}$ en la separación de fracciones proteicas.

El ajuste de los datos experimentales a los modelos de ensuciamiento se representa en la Figura 6.2. Sólo fue posible ajustar los datos a los modelos de bloqueo completo de poro y bloqueo interno.

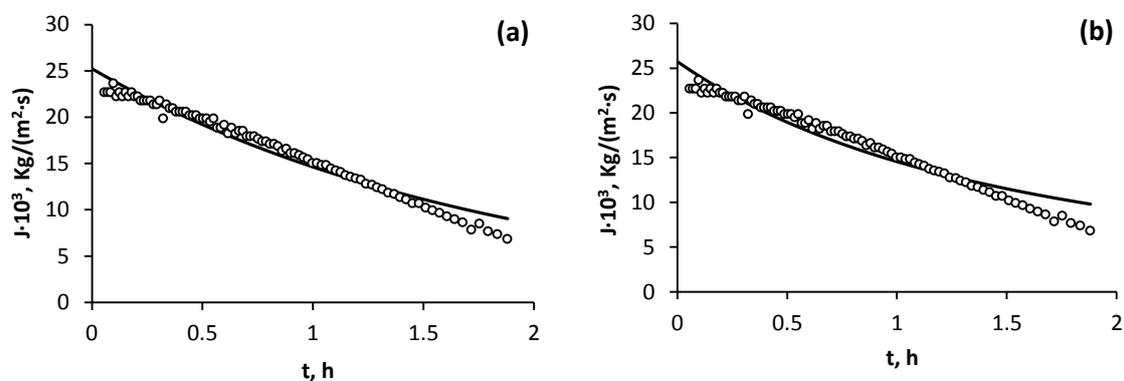


Figura 6.2. Ajuste a modelo de bloqueo de poro completo (a) y bloqueo interno (b) para membrana de $0.14 \mu\text{m}$. Datos experimentales (\circ), modelo ajustado ($-$).

Los datos del ajuste se presentan en la Tabla 6.1. El modelo que mejor ajusta los datos experimentales fue el de bloqueo completo de poro. Algo que no es sorprendente debido a que las caseínas son solutos grandes que podrían bloquear completamente el poro. El valor para el parámetro J_{lim} fue 0, lo que indica que no se alcanzaría el estado estacionario en ningún momento. La membrana se iría colmatando hasta que no hubiera flujo de filtrado. Por este motivo, hay que tener muy en cuenta no sobrepasar una reducción de flujo superior al 70 % ya que de superarse podría producirse una colmatación irreversible que haría mucho más difícil la recuperación de la membrana.

Tabla 6.1. Parámetros estimados para modelos de ensuciamiento para membrana de 0.14 μm .

Modelo	$J_0 \cdot 10^3,$ $\text{Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	$J_{lim} \cdot 10^3,$ $\text{Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	$k_2 \cdot 10^5,$ s^{-1}	$K_s',$ $(\text{kg} \cdot \text{s})^{0.5}$	R^2
Completo	12.26	0.04	5.64		0.9966
Interno	12.68			23.41	0.9926

Debido al tamaño de poro usado en la filtración, las caseínas permanecieron en el retenido mientras que las proteínas séricas atravesaron la membrana y pasaron al filtrado. Puesto que no se trabajó en diafiltración, algunas proteínas séricas permanecieron en el retenido, si bien se pueden considerar despreciables frente a la cantidad de caseínas en el mismo. De acuerdo con la concentración proteica de las fracciones obtenidas (Tabla 6.2), se observó una importante concentración de proteína en el retenido, algo lógico si tenemos en cuenta que las caseínas suponen alrededor de un 70 % de las proteínas y que la mayor parte del agua se retira en la corriente de filtrado.

Tabla 6.2. Concentración de proteína de la leche (inicial) y de los productos de su filtración (retenido y filtrado).

Muestra	Concentración proteica, g/L
Inicial	25.14
Retenido	63.50
Filtrado	3.15

Una vez finalizada la filtración de la leche, la membrana se sometió a un proceso de limpieza siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.4 de la sección de “Materiales y métodos”. Es muy importante recuperar la membrana correctamente, ya que el proceso de obtención de las fracciones proteicas se utilizará en numerosas ocasiones durante el trabajo para producir los sustratos de partida. Es necesario que estos sustratos de partida sean lo más parecidos posibles entre sí, para ello la membrana siempre debe presentar unas condiciones de filtración

similares. Con el objetivo de asegurar la adecuada recuperación de las características filtrantes de la membrana hasta valores de permeabilidad similares a los iniciales, se realizaron calibrados con agua tras la filtración y después de la limpieza química. En la Figura 6.3 se muestran los flujos de filtrado obtenidos en la filtración de agua a distintos valores de presión transmembrana para la membrana después de la filtración (○) y para la membrana después de la limpieza (▲). La permeabilidad se determinó con la pendiente de estas rectas.

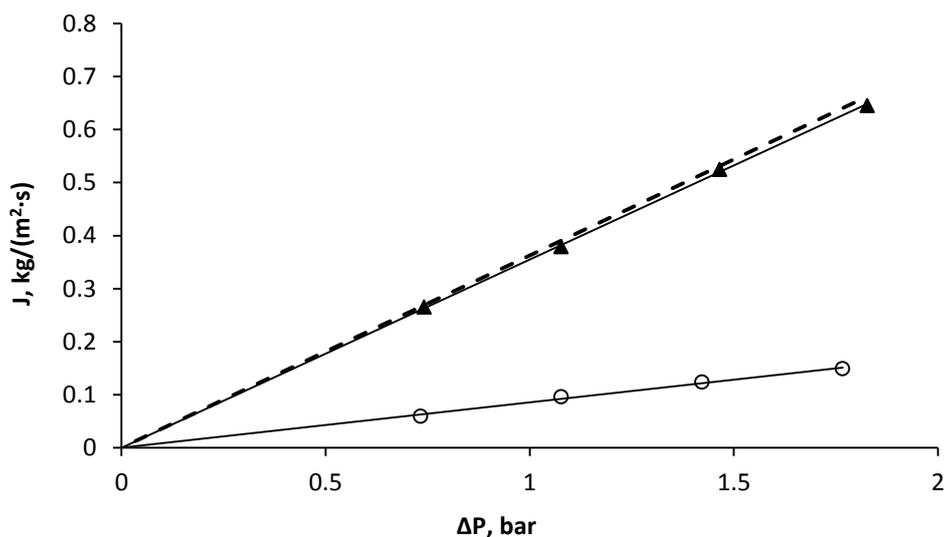


Figura 6.3. Flujo de agua frente a presión transmembrana para membrana de 0.14 μm . Flujo antes de limpieza (○), después de la limpieza (▲) y permeabilidad de membrana virgen (línea discontinua).

Como se observa en la Figura 6.3, la permeabilidad de la membrana se recuperó totalmente después de la limpieza, coincidiendo prácticamente con la línea discontinua que determina la permeabilidad de la membrana virgen. La limpieza hizo que la permeabilidad de la membrana pasara de $85.58 \cdot 10^{-3} \text{ Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar})$ a $354.75 \cdot 10^{-3} \text{ Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar})$ lo que supone una eficacia de la limpieza del 99.3 %, por lo que no fueron necesarias más etapas de limpieza.

6.4. CONCLUSIONES

El proceso de ultrafiltración por membranas cerámicas de 0.14 μm , con $v= 3.3 \text{ m/s}$, $T=50^\circ\text{C}$ y $\Delta P=1\text{bar}$, permite la separación de las fracciones proteicas, caseínas y proteínas séricas, de la leche de cabra. El descenso de flujo observado durante el proceso se ajusta al mecanismo de bloqueo completo de poro. La etapa de limpieza alcalina propuesta (20 g/L de NaOH y 2g/L de SDS, $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$, $v=3.3 \text{ m/s}$, $\Delta P =1 \text{ bar}$ y 30 min) recupera las características filtrantes de la membrana al 99%, lo que permite su reutilización.

7. Influencia del sustrato y de la enzima en la actividad inhibidora de ACE

7.1. PLANTEAMIENTO

Debido a la diferente especificidad de las enzimas, los péptidos generados durante la hidrólisis pueden variar considerablemente y con ellos las características inhibidoras de ACE de los hidrolizados. Por tanto, sería interesante comprobar cómo afecta a la hidrólisis de las proteínas de la leche de cabra el empleo de distintas enzimas tanto individualmente como en combinación.

En este apartado se detallaran los cambios producidos en la actividad inhibidora durante la hidrólisis de proteínas de leche de cabra al ser sometida a distintos procesos de hidrólisis. Los sustratos empleados en el estudio son caseínas, proteínas séricas de leche de cabra, así como la propia leche de cabra desnatada, mientras que las enzimas seleccionadas son subtilisina, tripsina y su mezcla. Para cada una de las combinaciones posibles (3 sustratos X 3 tratamientos) se determinará la evolución de la actividad inhibidora y el grado de hidrólisis con el tiempo. El objetivo principal es determinar cómo se ve afectada la actividad inhibidora y el grado de hidrólisis a lo largo de la reacción enzimática para las distintas fracciones proteicas que componen la leche de cabra.

7.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las fracciones proteicas de la leche (caseínas y proteínas del lactosuero) han sido obtenidas previamente mediante el procedimiento descrito en el capítulo anterior (“Fraccionamiento de proteínas de leche de cabra con membranas”). Cada una de estas fracciones (retenido y filtrado), así como la leche desnatada, han sido sometidas a 3 procesos de hidrólisis con las siguientes enzimas:

- 1) Subtilisina (S).
- 2) Tripsina (T)
- 3) Con la combinación de ambas simultáneamente (ST)

La temperatura de reacción se ha mantenido en 50 °C y la concentración de enzima se ha variado de acuerdo al sustrato empleado siendo de 5, 0.5 y 1.6 g/L para retenido, filtrado y leche desnatada, respectivamente. Todas las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo en el dispositivo experimental A (reactor encamisado de 250 mL) cuya forma de operar se detalla en el apartado 4.3. El tiempo de reacción ha sido 3 h, durante el cual se ha monitorizado continuamente el grado de hidrólisis (DH) mediante el método del pH-estado.

La evolución de la actividad inhibidora se ha determinado extrayendo muestras (100 μ L) a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 150 y 180 min. Estas muestras han sido desactivadas térmicamente a 100 $^{\circ}$ C durante 15 min y congeladas a -20 $^{\circ}$ C hasta su análisis posterior. La medida de la actividad inhibidora (ACEI) se ha realizado mediante el procedimiento espectrofotométrico descrito en el punto 4.4.1. En esta ocasión, para el análisis de inhibición de ACE, se han empleado unas diluciones de 1:10 y 1:50 para las muestras de hidrolizado de leche y caseínas, respectivamente. El objetivo de estas diluciones es evitar la obtención de valores de absorbancia elevados que generarían medidas no lineales.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hidrólisis llevadas a cabo permiten estudiar la evolución del grado de hidrólisis y la actividad inhibidora de ACE a lo largo de la reacción.

7.3.1. Grado de hidrólisis

Como se observa en la Figura 7.1, todas las curvas obtenidas presentaron la forma característica de una reacción enzimática. Inicialmente, la enzima ataca los enlaces del sustrato a una velocidad constante, esta etapa se corresponde con la zona en la que se observa un aumento lineal de DH. A medida que avanza la reacción, se van agotando los enlaces susceptibles de ser atacados, disminuyendo la cantidad de enlaces rotos por unidad de tiempo (disminuye la velocidad de la reacción), lo que se manifiesta en forma de curva asintótica en la gráfica. Dependiendo de las condiciones del ensayo y del tipo de enzima, el tiempo de la etapa inicial puede variar significativamente. Las curvas obtenidas mostraron un periodo de velocidad constante breve (inferior a 20 min) sin duda debido a la concentración relativamente alta de enzima. En especial, las hidrólisis con tripsina presentaron periodos iniciales más cortos, debido a la menor concentración de sustrato, es decir, debido al menor número de enlaces susceptibles de ser atacados.

El comportamiento de DH en los distintos tratamientos fue parecido para todos los sustratos estudiados. La hidrólisis que combina ambas enzimas siempre originó unos DH mayores, mientras que la hidrólisis con tripsina fue la que menores DH generó. Estos valores bajos de DH para tripsina pudo ser debido a la mayor especificidad que posee esta enzima, lo que limita el número de enlaces a los que puede atacar. En la Tabla 7.1 se detallan los valores finales de DH alcanzados en cada hidrólisis, que confirman lo anteriormente dicho.

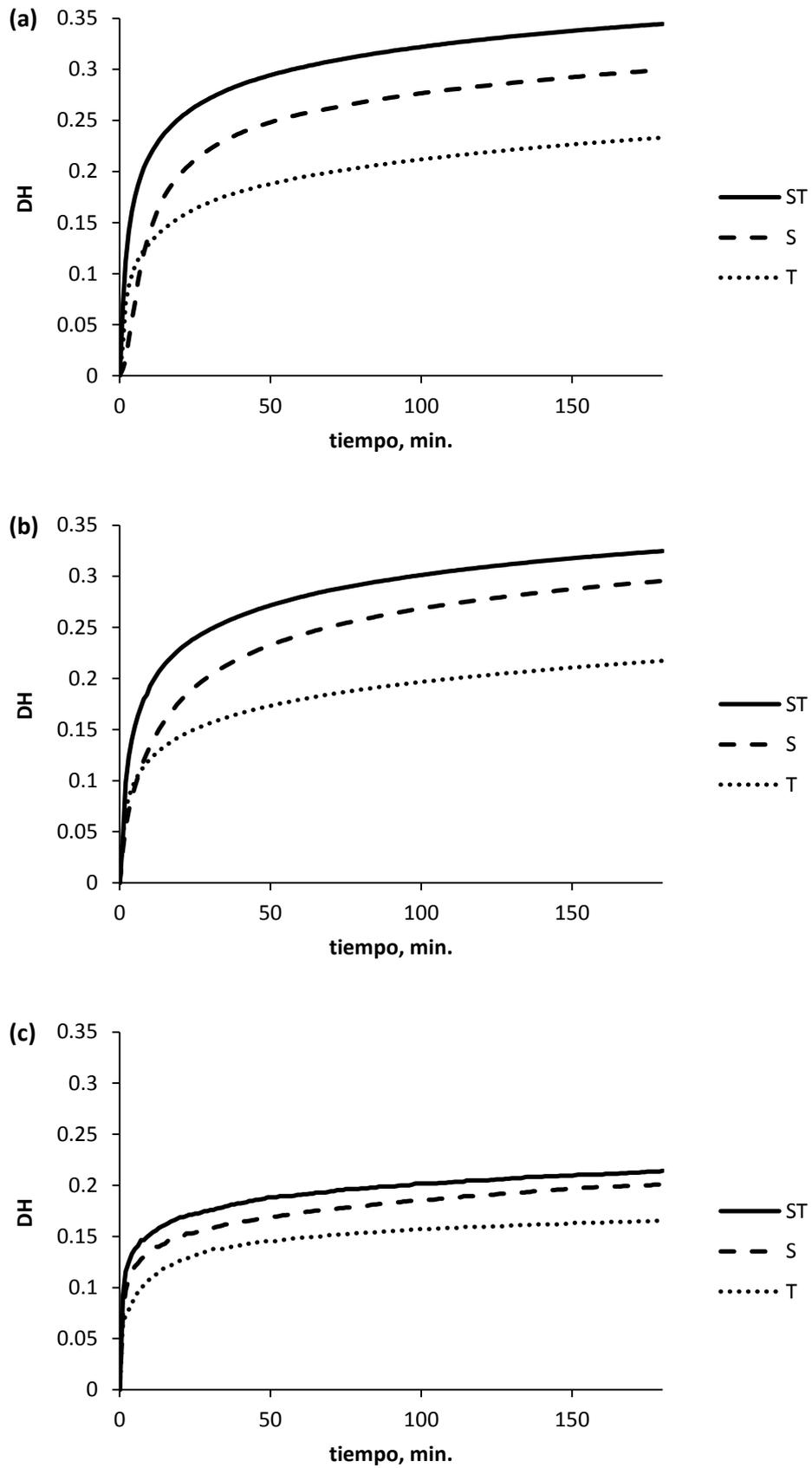


Figura 7.1. Curvas de hidrólisis de distintos tratamientos en leche (a), retenido (b) y filtrado (c).

Tabla 7.1. Valores finales de DH para cada uno de los tratamientos y sustratos empleados.

Sustrato	Tratamiento	DH final
Leche	S	0.299
	T	0.233
	ST	0.344
Retenido	S	0.295
	T	0.217
	ST	0.325
Filtrado	S	0.201
	T	0.165
	ST	0.214

Los valores de DH alcanzados fueron altos, lo que permitiría obtener una gran cantidad de péptidos de pequeño tamaño. El que los péptidos originados durante la hidrólisis presenten tamaños moleculares reducidos favorecería su actividad inhibidora de ACE, ya que, como se indicó en la “Introducción”, los péptidos inhibidores de ACE suelen presentar cadenas peptídicas cortas (2-12 aminoácidos). Además, se ha comprobado cómo a mayor longitud de la cadena peptídica, menor potencial inhibidor *in vivo* del péptido (Robert et al., 1999)

7.3.2. Actividad inhibidora de ACE

En la Figura 7.2, Figura 7.3 y Figura 7.4 se representa la evolución de ACEI con el tiempo para cada uno de los sustratos estudiados. En estas gráficas se representan los valores de inhibición de ACE obtenidos (en tanto por uno) en función del tiempo para cada uno de los tratamientos. Conjuntamente con estos resultados de ACEI se representan las curvas de hidrólisis para el tratamiento correspondiente, lo que permite observar en qué momento de la reacción enzimática se tomó cada muestra.

En todos los casos la actividad inhibidora de la proteína sin hidrolizar, representada por la muestra tomada a tiempo 0 (antes de añadir la enzima) fue despreciable. Por lo tanto, fue el inicio de la hidrólisis lo que provocó un aumento considerable de la actividad inhibidora de ACE. Para todos los tratamientos estudiados, en los primeros 5-10 min de reacción se produjo un gran aumento en la capacidad inhibidora. En esos primeros instantes la reacción de hidrólisis se encontraría en el periodo de velocidad constante, generándose gran cantidad de péptidos nuevos que mejoran el poder inhibidor del hidrolizado. Cuando la velocidad de hidrólisis disminuye, el número de péptidos generados es menor y existe mayor probabilidad de que las enzimas ataquen a péptidos activos ya formados por lo que la actividad inhibidora podría disminuir.

Las actividades de los hidrolizados obtenidos con distintas enzimas parecen comportarse de forma distinta entre sí. Para los obtenidos con subtilisina, después del aumento inicial en la actividad, ésta permaneció constante o descendió ligeramente durante algunos minutos. Alrededor del minuto 30-40 la actividad comenzó a aumentar de nuevo hasta alcanzar un máximo. Este aumento pudo ser debido a que la estructura de la proteína se abrió, permitiendo a la enzima liberar péptidos de la zona interior de la proteína, que por lo general contiene más grupos apolares. Como se indicó en la "Introducción", los grupos apolares en el tripéptido terminal favorecen la actividad inhibidora. Este aumento fue mucho más acusado para las caseínas. Tras este máximo y durante el resto de la hidrólisis, la actividad se mantuvo en un valor constante cercano (aunque más bajo) a este último máximo. Durante este periodo final, la pérdida de actividad debida a la destrucción de péptidos activos sería compensada por la aparición de nuevos péptidos activos de forma que la actividad inhibidora no varía.

En el caso de la hidrólisis con tripsina, el máximo de actividad se encontró en todos los casos en los primeros instantes de la hidrólisis, es decir, con grados de hidrólisis muy bajos. A partir de ese momento ACEI parece disminuir con DH. Al igual que en el caso de subtilisina, algunos de los péptidos activos formados serían degradados por la enzima. Pero en este caso debido a la alta especificidad de la misma, el número de enlaces disponibles sería menor y la posibilidad de generar nuevos péptidos activos se reduciría. Por tanto, la actividad inhibidora del hidrolizado disminuiría. El descenso de actividad fue evidente en el caso de caseínas (Figura 7.3) y más suave en el caso de proteínas del lactosuero (Figura 7.4). Estas diferencias confirmarían lo anteriormente expuesto, ya que el contenido en Lisina y Arginina que tienen las proteínas del lactosuero es mayor que el de las caseínas. Por tanto, para caseínas, al haber menos enlaces atacables, llegaría un momento en el que no sería posible generar nuevos péptidos activos y la actividad inhibidora se vería reducida. Se realizó una estimación del número medio de enlaces atacables por tripsina en cada una de las fracciones. Para ello, se tuvo en cuenta las proteínas mayoritarias de cada fracción y su proporción (Bernaka et al., 2011) así como su secuencia (base de datos UniprotKB). Obteniéndose unos valores medios de 18.7 y 23.2 enlaces/g proteína para caseínas y proteínas séricas, respectivamente. Un comportamiento similar se observó en el capítulo 5, "Optimización de la hidrólisis enzimática de leche de cabra", donde la actividad de los hidrolizados de leche con tripsina disminuía al aumentar DH.

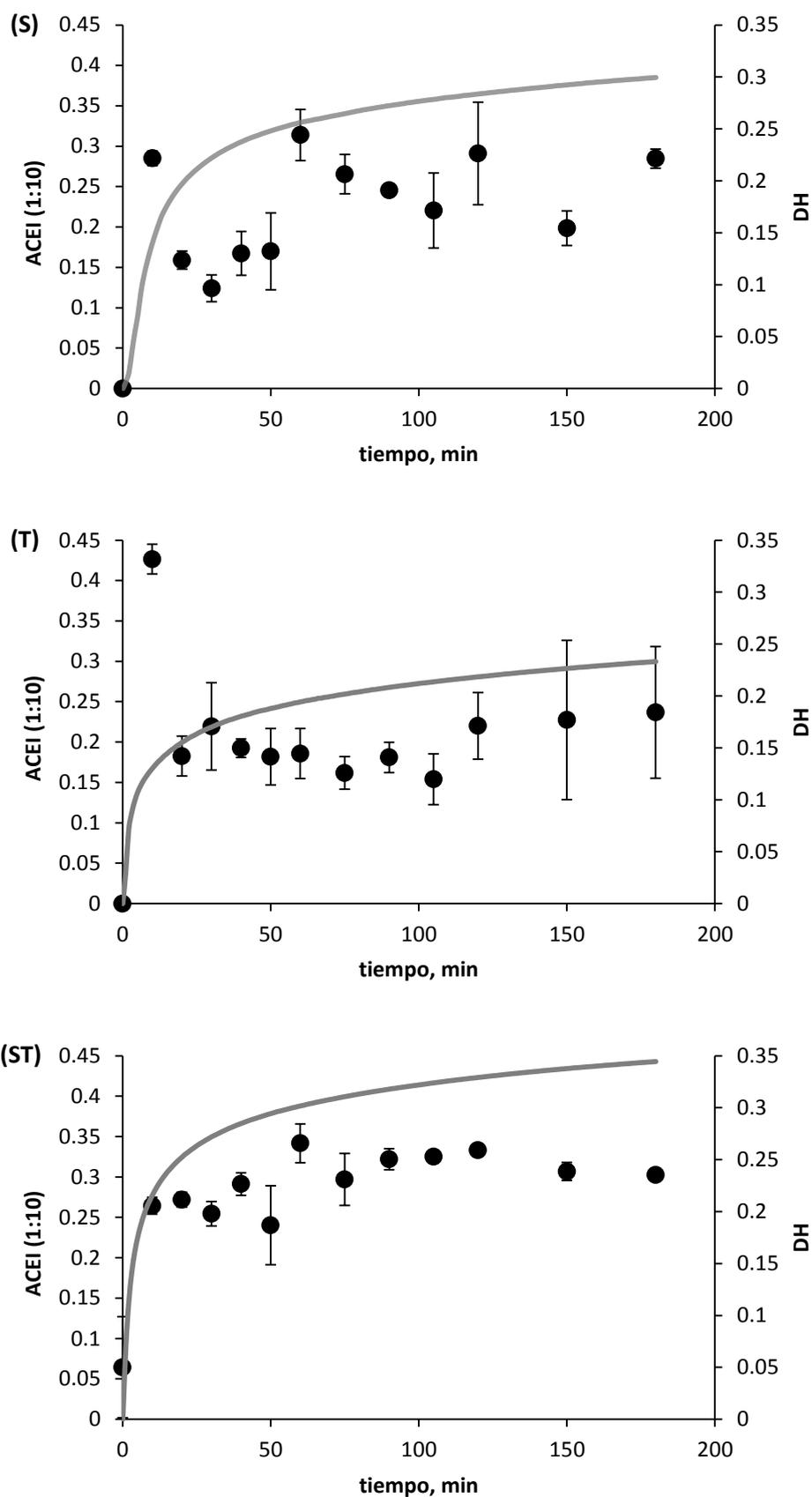


Figura 7.2. Evolución de los valores de inhibición de ACE durante la hidrólisis de leche mediante subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST).

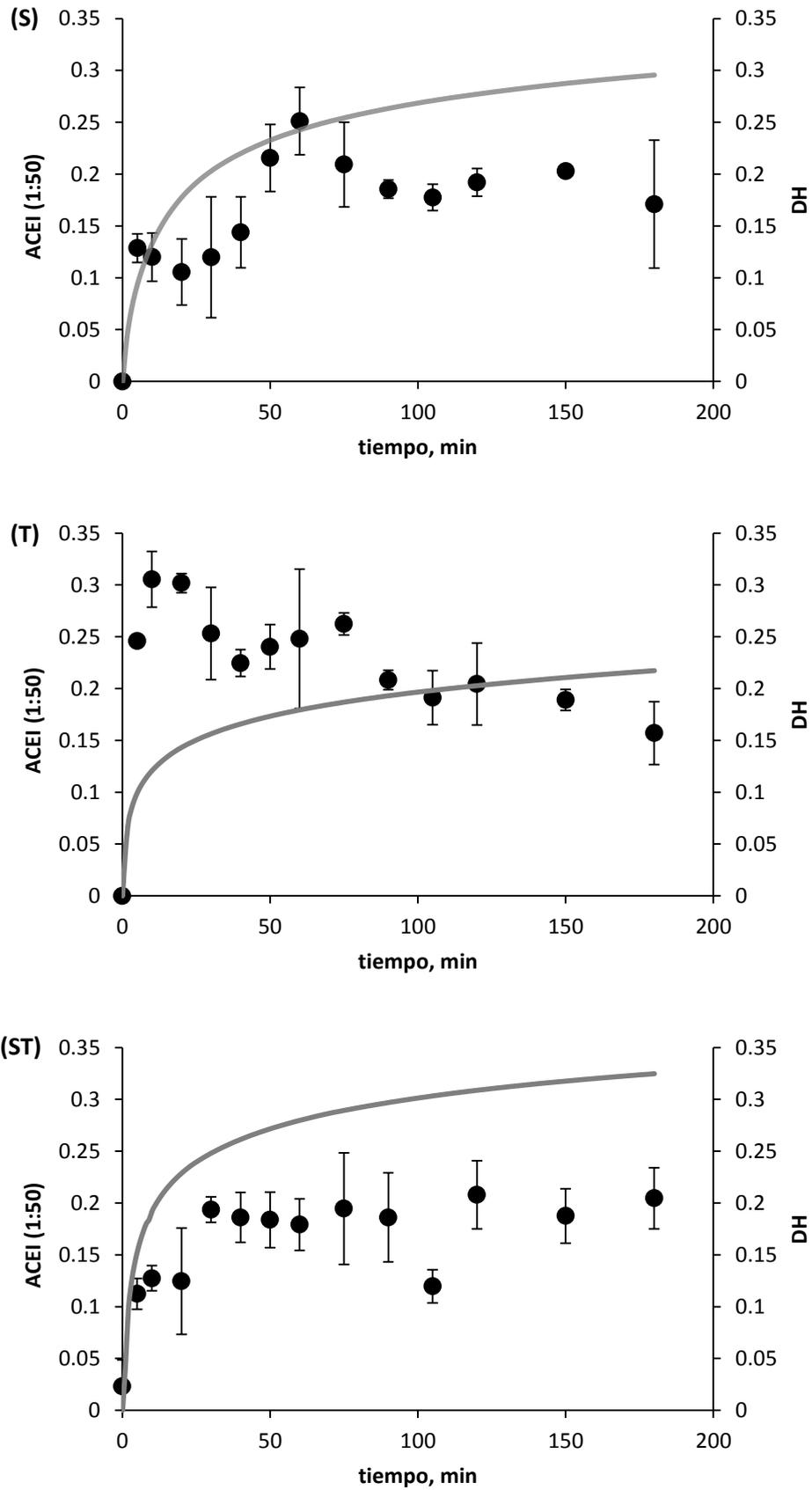


Figura 7.3. Evolución de los valores de inhibición de ACE durante la hidrólisis de retenido mediante subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST).

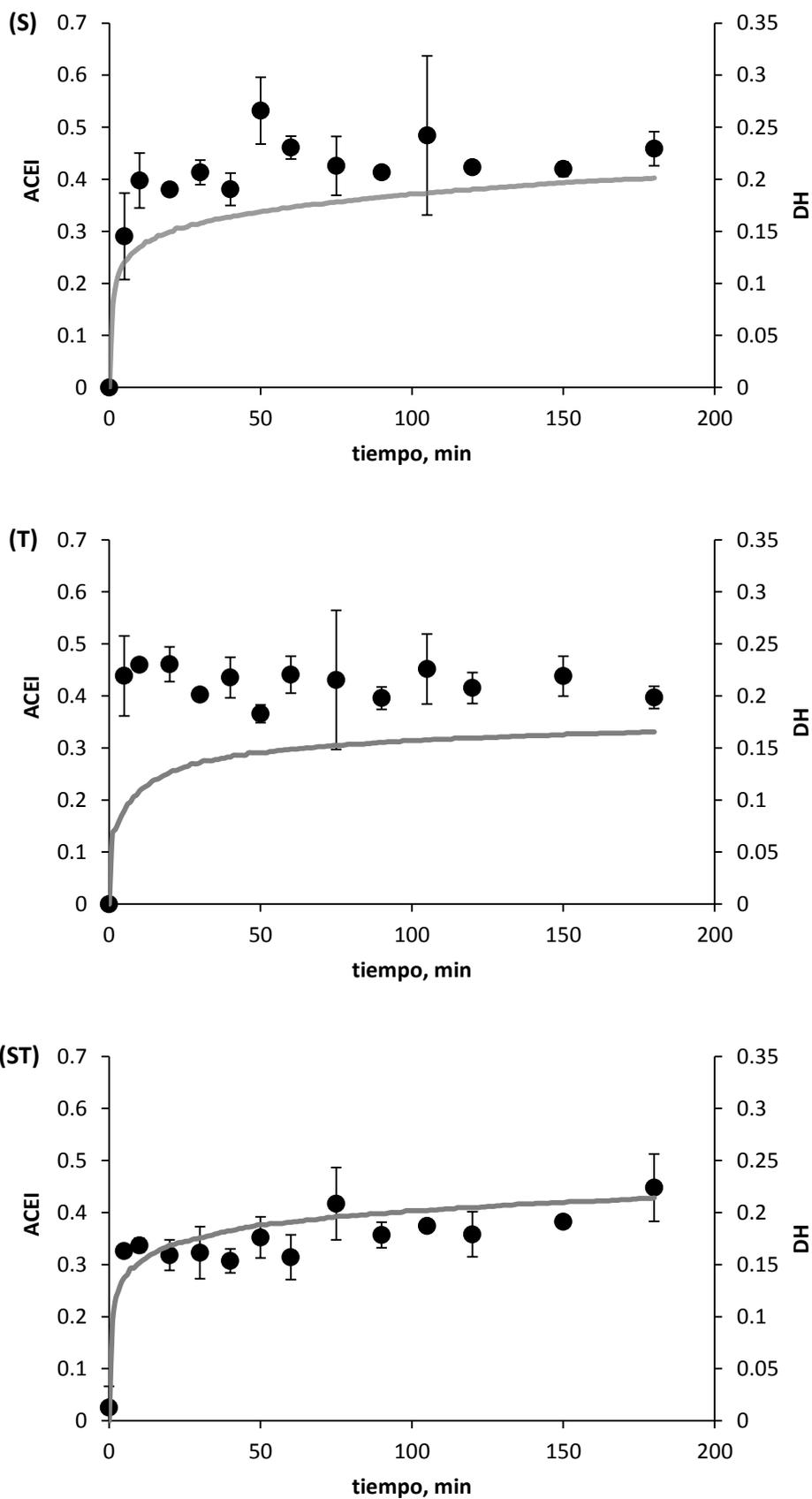


Figura 7.4. Evolución de los valores de inhibición de ACE durante la hidrólisis de filtrado mediante subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST).

Cuando la hidrólisis se realizó con las dos enzimas simultáneamente, el comportamiento fue similar al descrito para la hidrólisis con subtilisina aunque algo más suavizado. Es decir, una vez alcanzado el máximo de actividad, se mantuvo prácticamente constante hasta finalizar la hidrólisis.

Para estudiar de forma más exhaustiva la posible relación entre DH y ACEI, se representó un valor frente al otro (Figura 7.5). Como se observa, los valores del coeficiente de determinación lineal fueron muy bajos, lo que indica que no existe una relación lineal entre DH y ACEI. Tampoco resultaron apropiados ajustes a polinomios de mayor orden. Lo que hace pensar que no existe una relación entre ambas variables de salida.

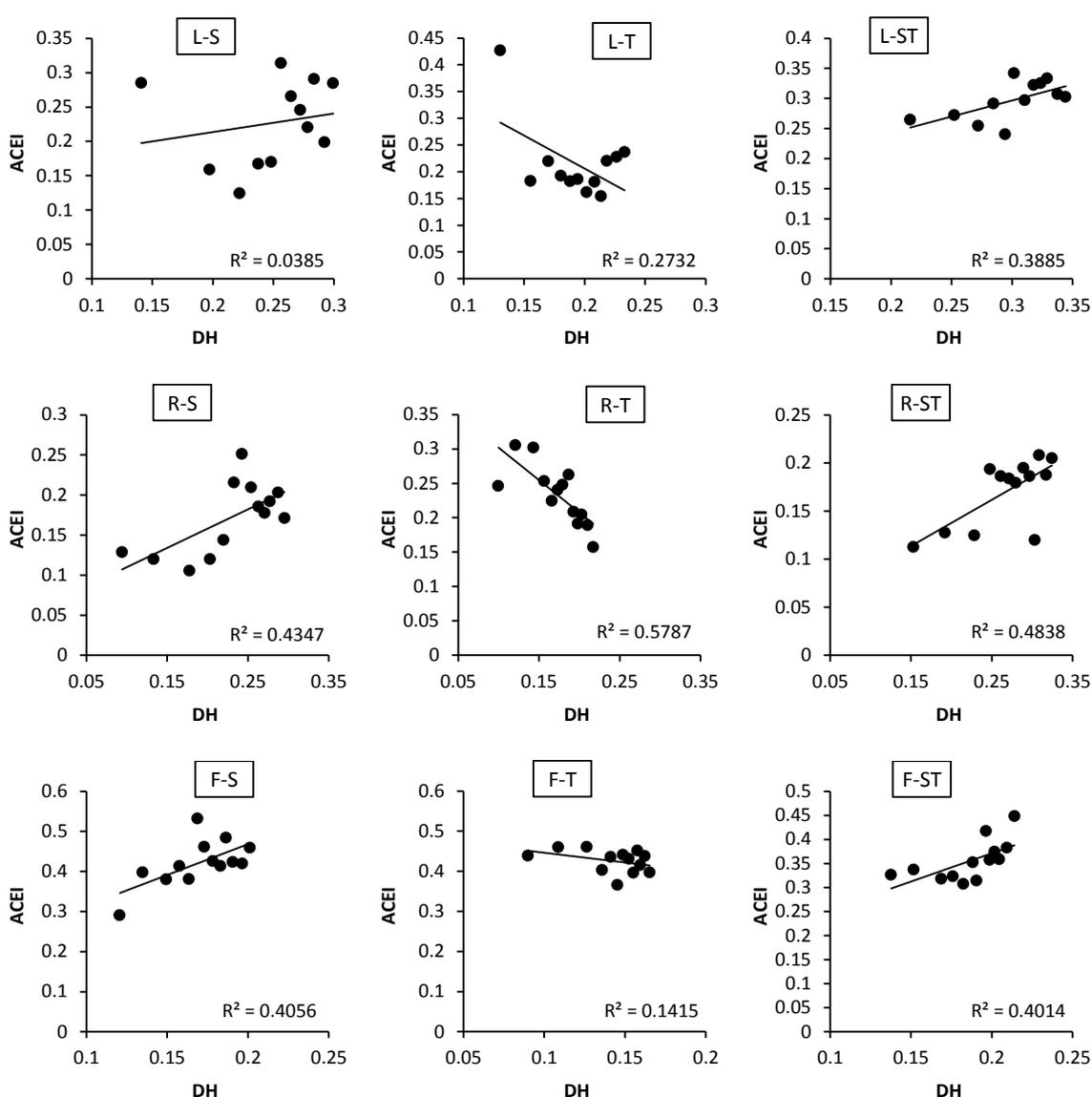


Figura 7.5. Relación DH y ACEI. Para las hidrólisis de leche (L), Retenido (R) y filtrado (F) con subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST).

A pesar de esta falta de relación aparente, se puede destacar que los ajustes fueron similares cuando se empleó la misma enzima. De forma que si, en la hidrólisis participó subtilisina, la pendiente de la recta de ajuste fue siempre positiva, lo que indicaría un aumento de ACEI con DH. Sin embargo, cuando se empleó tripsina aisladamente para la hidrólisis de cualquiera de los sustratos, la pendiente de la recta de ajuste fue negativa, lo que indicaría un empeoramiento de la actividad inhibidora al aumentar DH, que es un resultado similar al encontrado anteriormente (capítulo 5).

7.4. CONCLUSIONES

Los hidrolizados obtenidos con mezclas de enzimas de origen animal y bacteriano, tripsina y subtilisina, presentan los mejores valores para DH y ACEI. Sin embargo, no se encontró relación entre grado de hidrólisis y actividad inhibidora de ACE. La actividad inhibidora de ACE permanece prácticamente constante una vez transcurrida la primera hora de reacción. No obstante en los hidrolizados con tripsina se observa un leve descenso de la actividad inhibidora con el tiempo, especialmente apreciable en la hidrólisis de caseínas.

8. Caracterización e identificación de péptidos inhibidores de ACE

8.1. PLANTEAMIENTO

La actividad inhibidora de ACE del hidrolizado ofrece una información muy importante del hidrolizado en su conjunto. Sin embargo, en el proceso de hidrólisis enzimática se producen gran cantidad de péptidos, entre los que puede haber péptidos activos y otros que no lo son. Por tanto, es importante caracterizar el hidrolizado con el fin de conocer qué fracciones peptídicas son más activas, qué tamaño tienen los péptidos de esas fracciones o incluso llegar a identificar alguno de los principales péptidos presentes.

Los hidrolizados generados mediante los distintos tratamientos descritos en el capítulo anterior serán caracterizados mediante la obtención de su perfil peptídico. Además, para los de mayor capacidad inhibidora se llevará a cabo la separación de sus fracciones por cromatografía de exclusión de tamaños. Por último, se identificarán algunos de los péptidos presentes en las fracciones más activas.

8.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Un total de 9 hidrolizados han sido producidos como se describe en el capítulo anterior. Pero en esta ocasión, tras la desactivación enzimática, los hidrolizados han sido estabilizados mediante liofilización. Todo el tratamiento y análisis posterior descrito en este capítulo se ha llevado a cabo dentro del grupo de investigación Food Chemistry en el departamento de Food Science de la Universidad de Copenhague.

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ACEI) se ha determinado mediante el método fluorométrico descrito en el punto 4.4.2, mientras que la proteína ha sido determinada mediante el método ácido bicinconínico (apartado 4.5.2).

Los perfiles peptídicos de los hidrolizados han sido obtenidos mediante cromatografía líquida con el mismo procedimiento usado para la separación cromatográfica empleada en la identificación de péptidos. Para ello las muestras liofilizadas han sido disueltas en agua Milli-Q a una concentración 20 mg/mL inyectando 5 μ L de esta disolución. El fraccionamiento se ha llevado a cabo mediante cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 4.6. Por último, la identificación de péptidos en las fracciones obtenidas con SEC se ha realizado como se describe en el apartado 4.7. El volumen inyectado para el análisis de cada fracción ha sido de 25 μ L.

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Caracterización de hidrolizados

La actividad inhibidora de los 9 hidrolizados producidos se presenta en la Tabla 8.1, los códigos utilizados para identificar cada hidrolizado son los mismos que los empleados en el capítulo anterior.

Los valores de inhibición de ACE fueron obtenidos para disoluciones con una concentración de proteína similar, lo que permite comparar los hidrolizados entre sí. Los valores de inhibición obtenidos estuvieron comprendidos entre 30 % y 65 %. El filtrado siempre dio porcentajes menores de inhibición ($p < 0.0015$ en todos los tratamientos)

Tabla 8.1. Valores de inhibición de ACE de los hidrolizados producidos.

Hidrolizado	Sustrato	Enzima	ACEI ¹ (%)
M-S	Leche	Subtilisina	60.5 ± 2.3 ^a
M-T	Leche	Tripsina	50.9 ± 0.5 ^b
M-ST	Leche	Subtilisina + Tripsina	63.2 ± 2.8 ^{a,c}
R-S	Retenido	Subtilisina	60.7 ± 1.0 ^a
R-T	Retenido	Tripsina	54.4 ± 2.3 ^d
R-ST	Retenido	Subtilisina + Tripsina	64.3 ± 0.2 ^c
F-S	Filtrado	Subtilisina	41.9 ± 1.0 ^e
F-T	Filtrado	Trypsina	33.0 ± 0.6 ^f
F-ST	Filtrado	Subtilisina + Tripsina	50.6 ± 2.4 ^b

² ³ ¹ Cada hidrolizado fue disuelto a una concentración de 0.8 mg proteína/mL que se corresponde con 0.133 mg/mL en el ensayo. Valores de inhibición ACE con el mismo superíndice no son estadísticamente diferentes (método LSD).

Respecto a los tratamientos, se observó que la hidrólisis con tripsina siempre generaba los hidrolizados con menor actividad mientras que la combinación de ambas enzimas producía los hidrolizados más activos. Esta tendencia se observó para todos los sustratos aunque sólo para retenido y filtrado hubo una diferencia significativa entre los 3 tratamientos ($p = 0.004$ y 0.006 , respectivamente). Con la combinación de enzimas, los 3 sustratos generaron un hidrolizado con una capacidad inhibidora entre 50-70 %, la mayor fue la correspondiente al retenido.

Los perfiles peptídicos de los hidrolizados de filtrado se muestran en la Figura 8.1. Las muestras de filtrado tenían una concentración de proteína demasiado baja, lo que impidió ver

correctamente los péptidos a la concentración de liofilizado ensayada (20 mg/mL). Para conseguir una concentración adecuada para su análisis fue necesario preparar una disolución a una concentración más alta de liofilizado. Sin embargo, para concentraciones elevadas de liofilizado aparecieron problemas de precipitación que hicieron imposible su análisis. Este problema junto con los valores de inhibición de ACE inferiores al resto de hidrolizados, hicieron que el estudio se centrara en los dos sustratos que mejores resultados habían dado: leche y retenido.

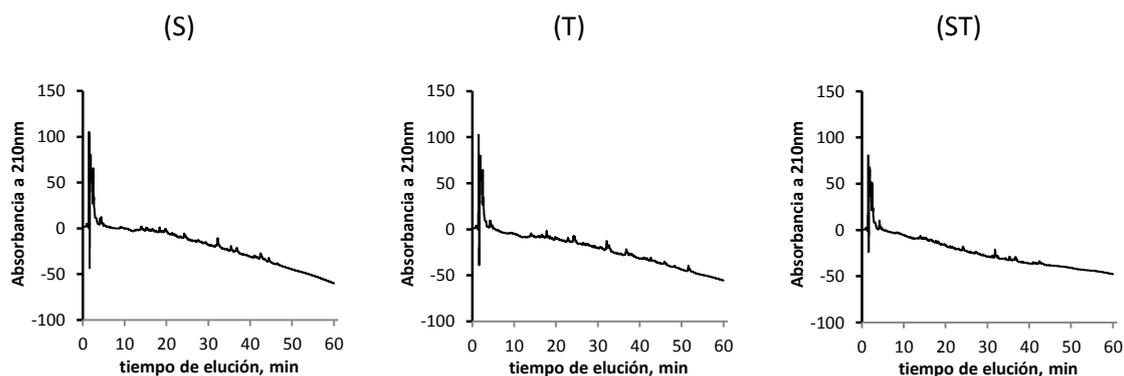


Figura 8.1. Perfiles peptídico de los hidrolizados de filtrado con subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST). Cada hidrolizado fue disuelto a 20 mg/mL antes de su análisis.

Tanto los hidrolizados de leche como los de retenido mostraron distintos perfiles peptídicos para cada tratamiento. Sin embargo, cuando la misma enzima fue usada, los cromatogramas de hidrolizados de leche y retenido fueron muy parecidos (Figura 8.2). Lo que es lógico si se tiene en cuenta que, al menos para subtilisina y la mezcla de ambas, los valores de inhibición de ACE obtenidos en leche y retenido no fueron estadísticamente diferentes. Además, se puede apreciar como la combinación de enzimas generó nuevos péptidos que no aparecían cuando subtilisina o tripsina se emplearon aisladamente. Lo que podría explicarse teniendo en cuenta que el grado de hidrólisis alcanzado con la combinación de enzimas fue ligeramente más alto, lo que indica que más enlaces fueron atacados y como consecuencia, nuevos péptidos fueron generados.

Atendiendo a la similitud entre los hidrolizados de leche y retenido se podría asumir que las proteínas del lactosuero, que estarían presentes en mayor proporción en la leche, no afectan significativamente a la actividad del hidrolizado final. Dado que el retenido está constituido básicamente por caseínas, supone un sustrato más concentrado y sencillo de estudiar que la leche. Debido a estas ventajas y a los buenos resultados de inhibición de ACE registrados, los hidrolizados de retenido fueron los seleccionados para los siguientes fraccionamientos y análisis.

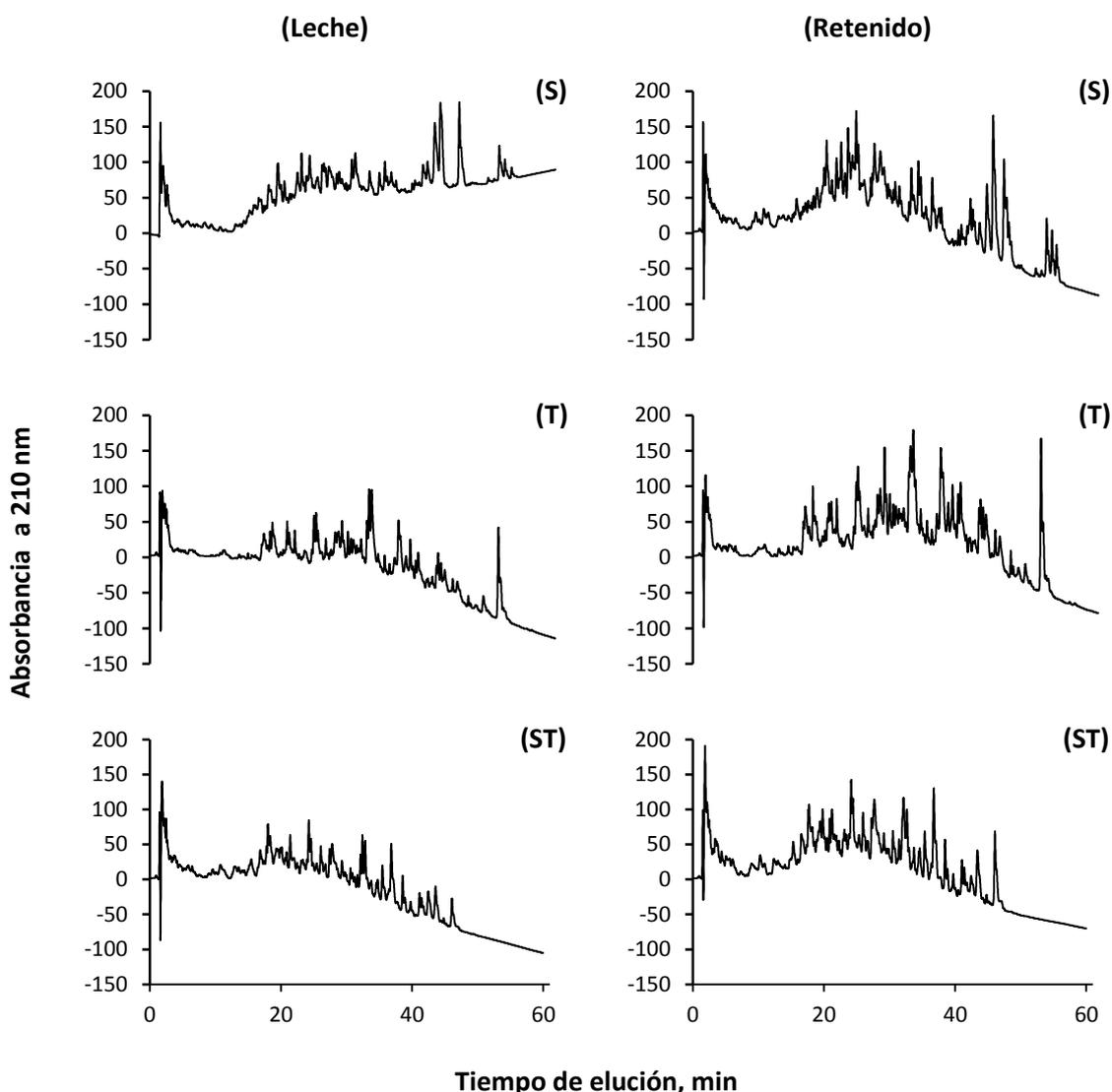


Figura 8.2. Perfil peptídico de los hidrolizados de leche (izquierda) y retenido (derecha) con subtilisina (S), tripsina (T) y la mezcla de ambas (ST). Cada hidrolizado fue disuelto a 20 mg/mL antes de su análisis.

8.3.2. Fraccionamiento de hidrolizados

Los perfiles de elución obtenidos mediante el fraccionamiento de exclusión de tamaños de los tres hidrolizados de retenido fueron muy similares (Figura 8.3). Básicamente se pueden distinguir 4 picos mayoritarios denominados P1, P2, P3 y P4 de menor a mayor tiempo de elución. En todos los casos, el primero (P1) fue alto y estrecho, el segundo incluso más alto que el primero y bastante ancho mientras que los dos últimos picos fueron mucho menores. Se observó que cuando se empleaban enzimas aisladamente, había un aumento de la concentración de péptidos en la parte inicial de P2, mientras que las últimas fracciones (P3 y P4) se reducían. Este hecho, junto con el menor grado de hidrólisis de estos hidrolizados (véase

punto 7.3.1), apunta hacia una mayor concentración de péptidos de mayor tamaño en R-S y R-T. Para poder analizar estas variaciones, los picos mayores (P2) de los hidrolizados de subtilisina y tripsina fueron fraccionados en varias partes. Las distintas fracciones recolectadas se representan separadas por líneas verticales en la Figura 8.3. En total se recolectaron 5 fracciones en R-S, 8 en el caso de R-T y sólo 4 para el hidrolizado R-ST.

Mediante la curva de calibración (Figura 4.15) fue posible determinar aproximadamente el rango de tamaños de cada fracción. En todos los casos, la fracción P1 contenía péptidos con tamaños moleculares entre 70.2 y 22.3 kDa. En el caso de P2, los péptidos tendrían un tamaño menor de 4 kDa para R-T y R-S, mientras que para la fracción P2 de R-ST el límite superior se situó en 1.7 kDa. Los volúmenes de elución de P4 y P5 fueron mayores que el volumen total de la columna, por lo que muy probablemente estas fracciones contuvieran péptidos que interactuaron con el gel de la columna, lo que retrasó su salida.

La actividad inhibidora de ACE de las fracciones se muestra en la Figura 8.4. El valor de ACEI más alto (> 80 % de inhibición) se obtuvo siempre en la fracciones P2 de los hidrolizados. Para el hidrolizado R-ST esta fracción tendría un tamaño comprendido entre 1700-55 Da. Sin embargo, para el hidrolizado de subtilisina (R-S), la actividad inhibidora medida en la fracción P2a fue muy baja, por lo que la mayoría de péptidos activos se recuperaron en la fracción P2b (que posee un rango de tamaños = 1300-75 Da). Para el hidrolizado R-T, la actividad inhibidora de ACE se concentró en P2b, P2c, P2d y P2e (rango de tamaños = 2300-55 Da). Las fracciones P3 y P4 tuvieron porcentajes menores de inhibición en todos los casos, sin embargo, la concentración de proteína en estas fracciones fue también más baja. Especialmente P4 tuvo un valor relativamente alto de inhibición con una concentración de proteína mucho más baja que cualquier otra fracción. Las fracciones P4 que mejores resultados mostraron fueron las de los hidrolizados R-ST y R-T, ya que fueron capaces de inhibir a ACE al 40 % conteniendo tan sólo una concentración de proteína equivalente al 4 % del contenido de proteína que presenta la fracción P2. Por tanto, los péptidos de estas fracciones podrían ser muy buenos inhibidores de ACE.

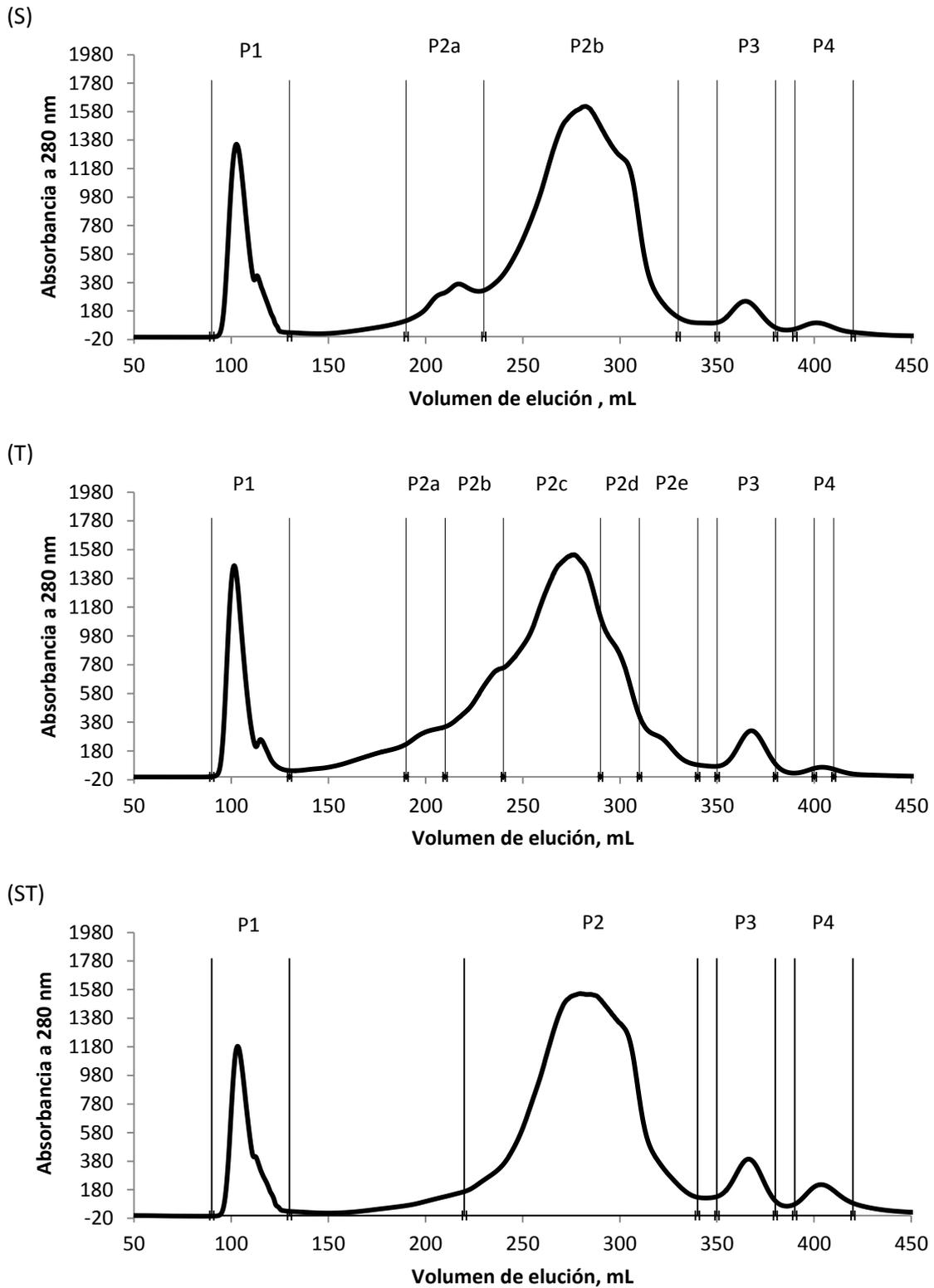
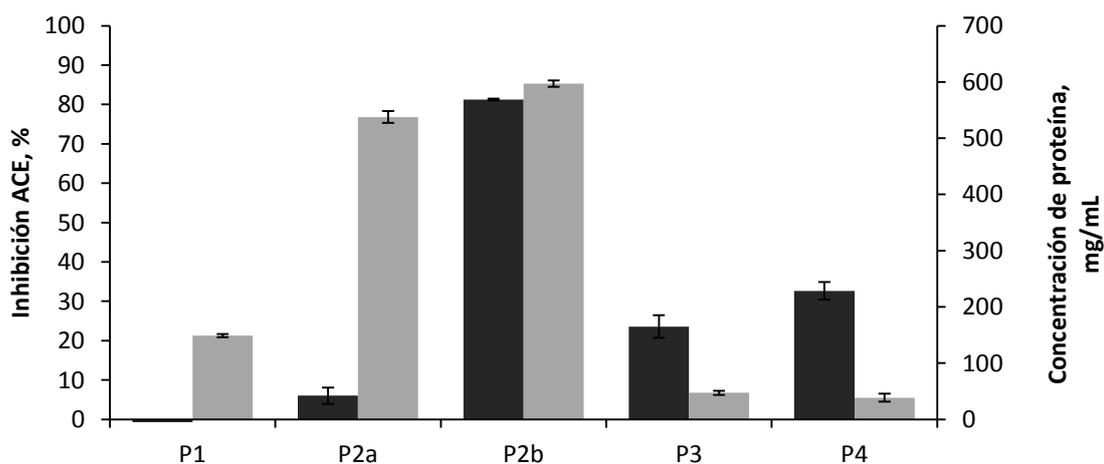
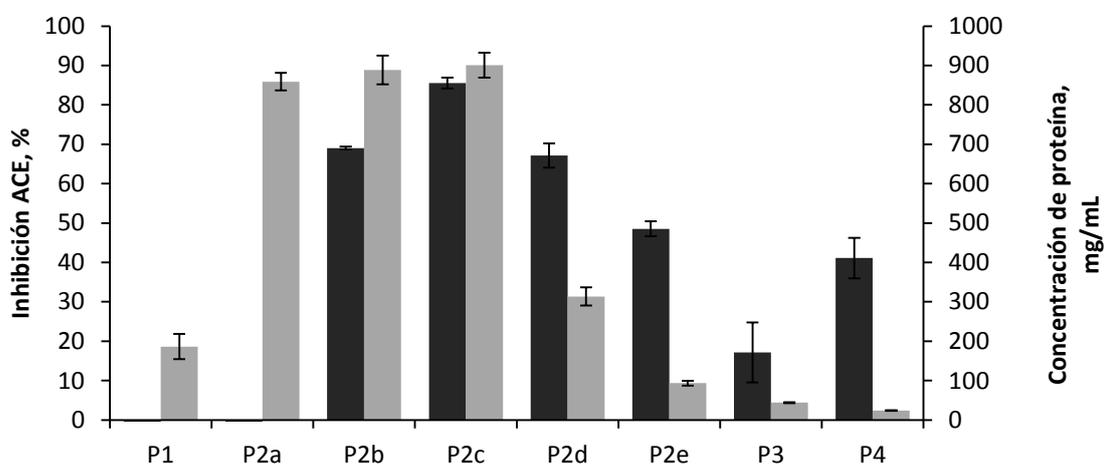


Figura 8.3. Perfiles del fraccionamiento por exclusión de tamaños para los hidrolizados de retenido con subtilisina (S), tripsina (T) y la combinación de ambas (ST).

(S)



(T)



(ST)

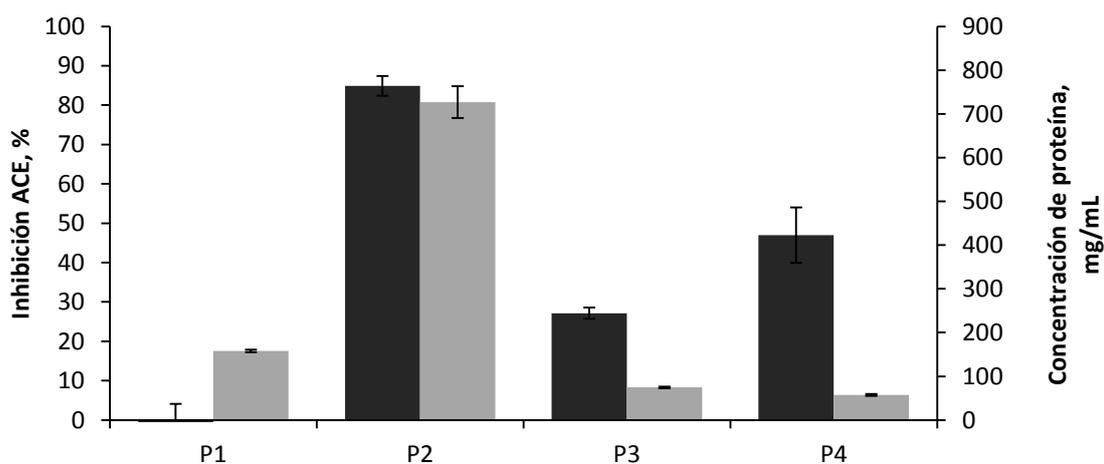


Figura 8.4. Actividad inhibidora (negro) y concentración proteica (gris) para las fracciones de los hidrolizados de retenido con subtilisina (S), tripsina (T) y la combinación de ambas (ST).

Mediante la determinación de los valores de IC_{50} (concentración de péptidos que reduce la actividad de ACE al 50 %) fue posible comparar la capacidad inhibidora de las distintas fracciones. En general, los valores IC_{50} obtenidos (Tabla 8.2) fueron bastantes similares y variaron entre 5 y 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados mejorarían los obtenidos por Minervi et al. (2003), que obtuvieron valores de IC_{50} entre 16 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fracciones de hidrolizado de caseínas producido con una proteinasa procedente de *Lactobacillus helveticus*. La capacidad de las fracciones obtenidas en este estudio fue muy alta, en especial para las fracciones P4. De hecho, los valores obtenidos fueron tan sólo ligeramente inferiores al obtenido para IPP, uno de los mejores inhibidores de ACE identificados. Este tripéptido posee un IC_{50} de 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nakamura et al., 1995) y ha demostrado su actividad antihipertensiva tanto en animales como en humanos (Jäkälä y Vapaatalo, 2010; Xu et al., 2008). Además, los resultados de inhibición de ACE obtenidos apuntan hacia que las fracciones con menores tamaños moleculares presentan mejor actividad inhibidora. El mismo fenómeno fue descrito por Mao et al. (2007) y más tarde por Jiang et al. (2010), sin embargo, el mejor IC_{50} que obtuvieron fue tan solo de 461 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la fracción filtrada a través de una membrana de 3 kDa de un hidrolizado de caseína bovina. De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 8.2, todas las fracciones P2 (especialmente las de menor peso molecular) y las fracciones P4 obtenidas contendrían potentes péptidos inhibidores de ACE.

Tabla 8.2. Valores IC_{50} de las fracciones obtenidas por exclusión de tamaños a partir de los hidrolizados de retenido.

Hidrolizado	Fracción	IC_{50}
		(μg proteína/mL)
R-S	P2b	14.63 \pm 3.47
R-S	P4	5.53 \pm 0.71 ^a
R-T	P2b	56.96 \pm 5.99
R-T	P2c	17.74 \pm 1.34
R-T	P2d	15.37 \pm 2.39
R-T	P2e	8.04 \pm 4.08
R-T	P4	5.12 \pm 1.32 ^a
R-ST	P2	13.13 \pm 2.68
R-ST	P4	9.28 \pm 0.52 ^a

^a IC_{50} determinado previa concentración a vacío de la fracción

2

8.3.3. Identificación de péptidos.

Con el objetivo de identificar alguno de los péptidos que componen las fracciones más activas anteriormente obtenidas, éstas se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS. Los cromatogramas obtenidos para las fracciones de P2 se muestran en la Figura 8.5 junto con las masas observadas para cada uno de los compuestos. Estas fracciones presentaron gran número de péptidos, sin bien, no se conocía cuáles de ellos eran los que proporcionaban la actividad inhibidora en cada hidrolizado. Ésta podría ser originada por la combinación de numerosos péptidos inhibidores así como por la acción de péptidos “estimuladores”, que no inhibirían directamente a ACE pero que podrían favorecer la actividad inhibidora de otros.

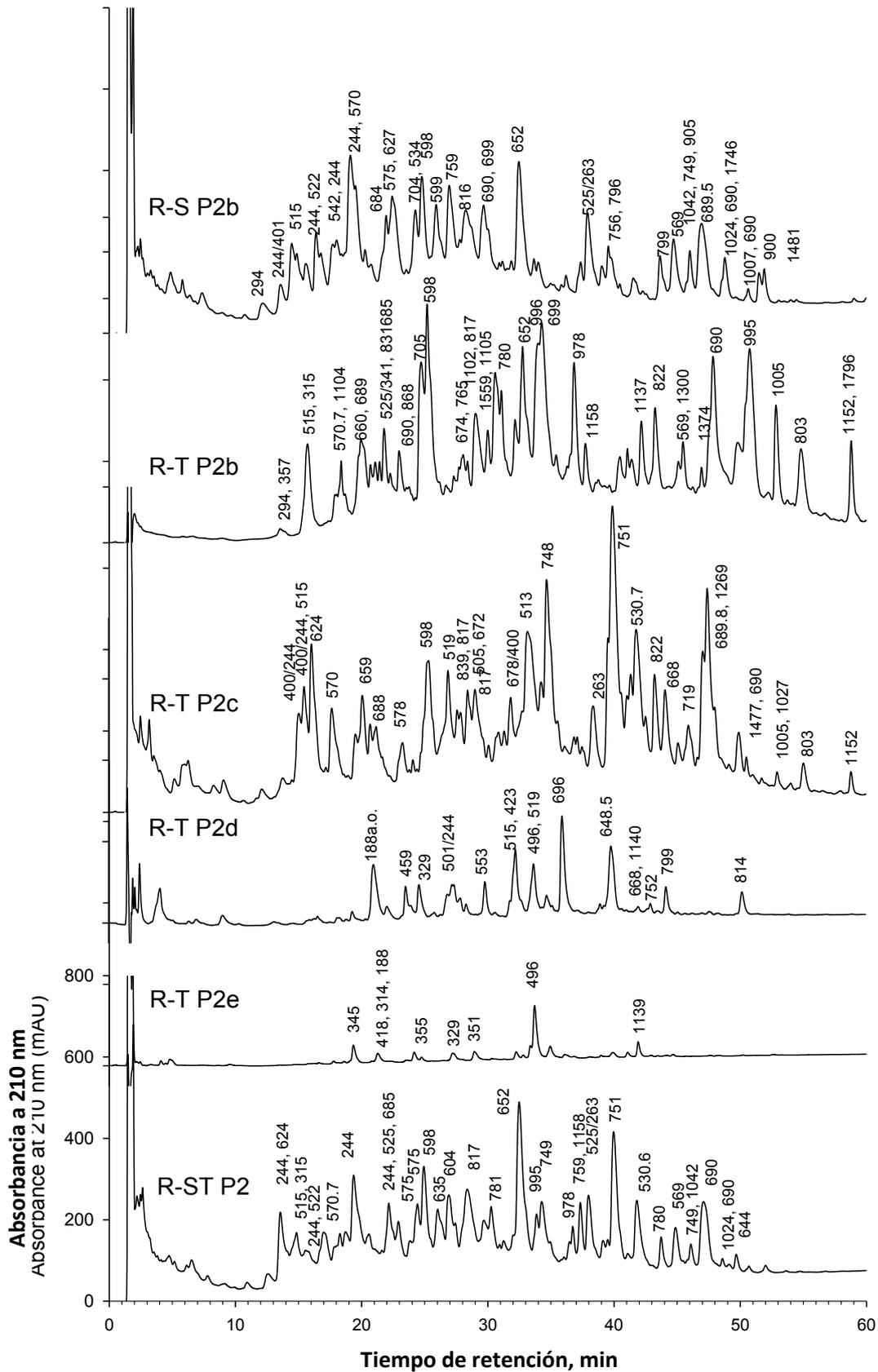


Figura 8.5. Perfiles peptídicos de las fracciones de P2 de la hidrólisis de retenido con subtilisina (R-S), tripsina (R-T), y su mezcla (R-ST), respectivamente. Los números sobre los principales picos representan las masas de los péptidos ($[M+H]^+$).

Para la determinación de las masas de cada uno de los péptidos se empleó el software Data Analysis (Bruker). Como ejemplo, en la Figura 8.6 se representa el espectro de masas promedio generado a partir del penúltimo pico cromatográfico obtenido en R-T P2b y R-T P2c (Figura 8.5, tiempo de retención de 55 min). Tras un proceso de deconvolución se obtuvieron los estados de carga de cada uno de los péptidos, lo que permitió determinar la masa molecular de los mismos.

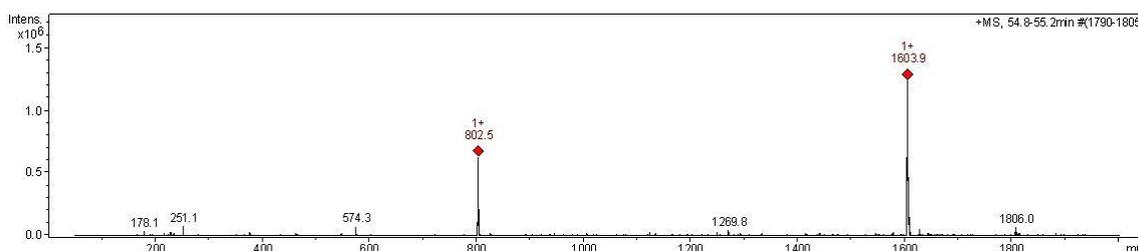


Figura 8.6. Espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico de R-T P2b con tiempo de retención de 55 min.

Las dos señales que destacan sobre el resto, 802.5 y 1603.9 m/z, serían las masas de los iones de los posibles péptidos que componen el pico cromatográfico (R-T P2b -55 min). De acuerdo con este espectro de masas, uno de los compuestos tendría el doble de masa que el otro. Además, si se observan los espectros de fragmentación para cada uno de estos dos iones (Figura 8.7), se puede comprobar como el compuesto de 1603.9 m/z presentó un espectro muy parecido al de 802.5 m/z. Sin embargo, el espectro MS/MS del ión de mayor masa (Figura 8.7b) contenía una señal mayoritaria a 802.5 m/z, por lo que se podría asumir que la señal a 1603.9 m/z se correspondería con un agregado de 2 péptidos cuya masa individual sería igual a 802.5 m/z. Y por tanto, la masa experimental del péptido eluido a los 55 min en el análisis de la fracción P2b del hidrolizado R-T, se estableció en 802.5 m/z.

De la misma manera se determinaron el resto de las masas de los péptidos dominantes en las fracciones P2 que se presentan en la Figura 8.5. Tanto la fracción P2d como la P2e del hidrolizado R-T contienen principalmente péptidos con valores de m/z de 459, 329, 553, 515, 496, 699, 648, 668, 803, 1140, 799 y 814. Las otras fracciones además contienen péptidos con m/z 598, 652, 748, 751, 690, 978, 995, 1005 y 1152. Todas estas masas representan a péptidos con carga simple.

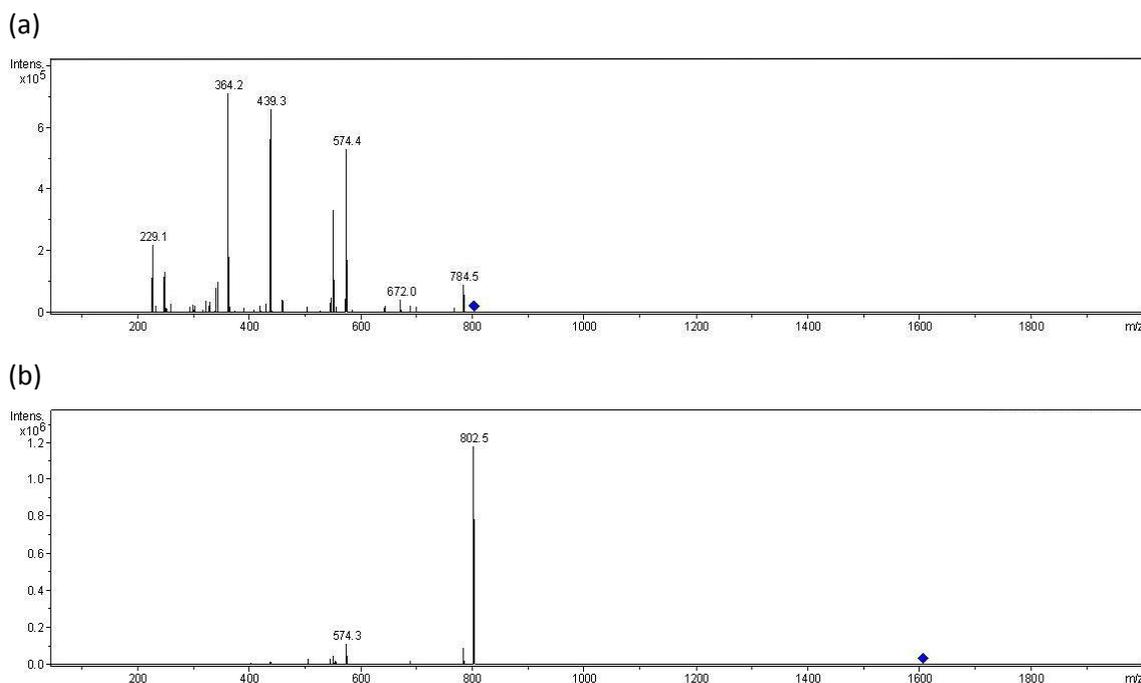


Figura 8.7. Espectros MS/MS de los iones con m/z 802.5 (a) y 1603.9 (b). Iones presentes en fracciones R-T P2b y RT-P2c (tiempo de elución de 55 min).

Continuando con el ejemplo anterior, en la Figura 8.8 se muestra el espectro MS/MS del ión precursor de 802.5 m/z y la secuencia de aminoácidos del péptido identificado. Este espectro es el resultado de promediar los espectros de fragmentación presentes en el pico cromatográfico. Es decir, que los espectros de fragmentación del agregado de 2 péptidos también participan de ese promedio. Es por esta razón que el ion original aparece con un valor alto de intensidad y no totalmente desfragmentado.

Siguiendo el procedimiento conocido como secuenciación *de novo* sería posible determinar la secuencia directamente del espectro de masas, sin consultar bases de datos. Este método de identificación se basa en que bajo condiciones suaves de disociación los péptidos se rompen por el enlace peptídico (C-N). Por tanto, se generarían 2 tipos de iones, codificados como “iones b” e “iones y”. Debido a que los iones sucesivos “b” o “y” difieren en un aminoácido, se podría deducir la secuencia calculando las diferencias de m/z que existen entre 2 iones contiguos. La masa calculada se compararía con las masas de los distintos aminoácidos para determinar de qué aminoácido se trata. En la Figura 8.8 se identificaron los distintos iones generados en la fragmentación del péptido que se ha tomado como ejemplo. Los iones y1 y b1 no fueron detectados, mientras que los iones más intensos fueron los iones y2, b5, y5, b2, y4 y b3. Tanto y2-b5 como y4-b3 se generan al romperse el enlace Leu-Pro. Parece ser que los ratios más altos de ruptura del enlace N-terminal adyacente a Pro se generan cuando Leucina

(Val, His, Asp o Ile) preceden a Pro (Breci et al., 2003), lo que explicaría que presenten una señal tan elevada.

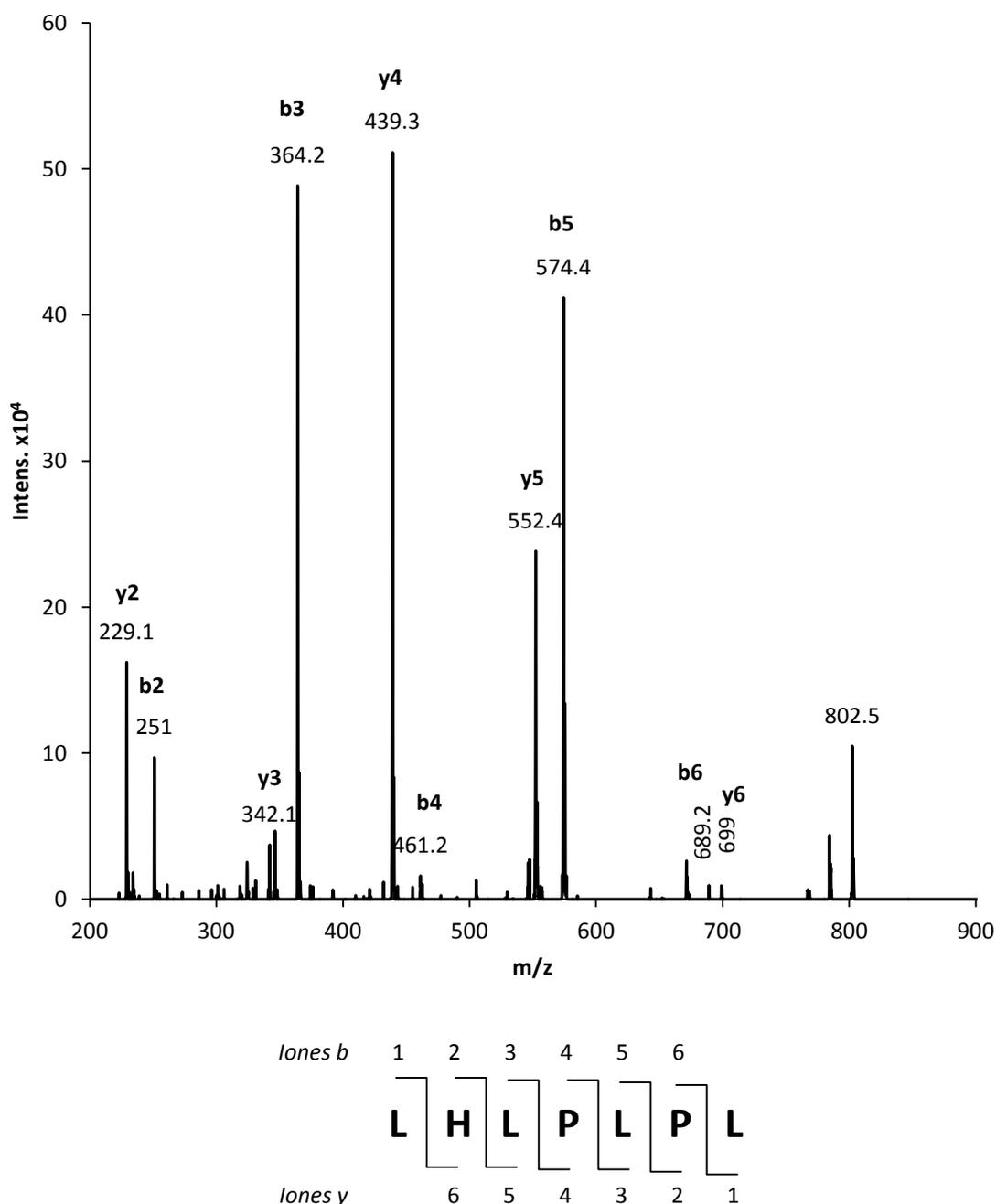


Figura 8.8. Espectro de MS/MS del ión con 802.5 m/z. Los fragmentos formados se designaron de acuerdo a la nomenclatura de Roepstorff y Fohlman (1984).

Sin embargo, en general y debido a la ambigüedad en la identificación de los picos, diferentes secuencias podrían ser identificadas para un mismo espectro. Más difícil aún resulta si los espectros no muestran señales claras de todos los iones “b” e “y”. Por tanto, para la identificación se empleó una técnica alternativa, utilizando un software especializado que permite comparar las señales del espectro con bases de datos de secuencias de proteínas. De

esta manera se identificarían diversas secuencias a las que se le asigna una puntuación en función de la probabilidad de que la identificación sea correcta.

En este trabajo la identificación fue llevada a cabo mediante el procesado de los espectros fragmentación de masas de cada péptido con un software BioTools, la identificación se realizó utilizando una base de datos con la secuencia de las proteínas de leche de cabra y sus diferentes variantes genéticas. Sólo algunos iones y sus correspondientes espectros de fragmentación pudieron asignarse a fragmentos originados por hidrólisis de las caseínas. De esta manera fueron identificados los péptidos originados a partir de β -caseína, α_1 -caseína y κ -caseína que se presentan en la Tabla 8.3. El péptido TGPIPN procedente de β -caseína ha sido identificado como un inhibidor de ACE previamente en hidrolizados de caseína producidos con tripsina (Geerlings et al., 2006). Otros péptidos originados a partir de β -caseína como LHLPLPL, HLPLPL y EMPFPK son similares a los identificados en β -caseína bovina (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Quirós et al., 2009). Además la actividad inhibidora de LHLPLPL parece verse incrementada después de la digestión (Quirós et al., 2009). Otras de las secuencias identificadas en este trabajo son muy parecidas a las de péptidos inhibidores previamente conocidos, es el caso de VLPVPQ (Maeno et al., 1996) y YPVEPF (Robert et al., 2004). Con respecto a los péptidos identificados que proceden de κ -caseína, YPSYGLNYY es muy similar al péptido inhibidor de ACE desarrollado por Chiba y Yoshikawa (1991). El péptido FLPYPY no ha sido identificado como un inhibidor de ACE, sin embargo podría estimular el crecimiento de neuritas (dendritas o axones) en ratones, lo que podría ser útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Sakaguchi et al., 2004). Los péptidos VVAPFPEVF y FVVAPFPEVF liberados de α_{s1} -caseína coincide con parte de la secuencia del péptido FFVAPFPEVFGK, identificado en hidrolizados de α_{s1} -caseína con tripsina y que presenta actividad *in vivo* (FitzGerald et al., 2004). Del mismo modo, Ong et al. (2007) identificaron un péptido similar (FVAPFPEVF) con actividad inhibidora de ACE en queso Cheddar. Es destacable que todos estos péptidos, incluyendo el identificado en este trabajo, podrían ser atacados por quimotripsina durante la digestión en el lado carboxílico del aminoácido fenilalanina (F), liberando el mismo péptido, PEVF, y ejercer un efecto antihipertensivo *in vivo*.

Por lo tanto, muchos de los péptidos identificados podrían contribuir en la actividad inhibidora de los hidrolizados de leche de cabra. Además de los péptidos mencionados, los hidrolizados contenían muchos otros péptidos en bajas concentraciones, algunos de los cuales podrían también contribuir a la bioactividad final.

Por otra parte, debido a la presencia de tirosina en el C-terminal de algunos de los péptidos identificados (FLPYPY e YPSYGLNYY), es de esperar que estos péptidos tengan buena actividad antioxidante (Tsoyama et al., 2011). Por lo que se podría plantear un estudio sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados de leche de cabra.

Tabla 8.3. Péptidos identificados en los fracciones P2 de los hidrolizados R-ST.

Masa [M+H] ⁺	Fracción	Tiempo retención (min)	Posible peptido	Masa calc.(M+H)	Score	Origen
459.3	R-T-P2d	23.8	n.i. ¹			
553.3	R-T-P2d	30.0	n.i.			
496.5	R-T-P2d+e	33.9	n.i.			
696.6	R-T-P2d	36.6	VPNSAE(1P) ²	696.7	96	α _{s1} -CN f72-77
648.7	R-T-P2d	39.9	n.i.			
667.5	R-T-P2c + d	44.2	n.i.			
803.0	R-T-P2b + c	55.0	LHLPLPL	802.5	130	β-CN f133-139
1140.6	R-T-P2d+e	42.0	YPSYGLNYY ²	1140.2	322	κ-CN f35-43
799,7	R-T-P2d	44.9	FLPYPY	799.4	64	κ-CN f55-60
814.9	R-T-P2d	50.4	n.i.			
598.6	R-ST-P2, R-S-P2b, R-T-P2b+c	25.1	TGPIPN	598.7	65	β-CN f63-68
652.7	R-STP2, R-S-P2b, R-TP2b	32.6	VLPVPQ ²	652.4	47	β-CN170-175
748,8	R-ST-P2, R-T-P2c	35.0	EMPFPK	748.9	92	β-CN f108-113
751.5	R-ST-P2, R-T-P2c	40.0	YPVEPF	751.9	65	β-CN f114-119
690.0	R-ST-P2, R-S-P2b, R-T-P2b+c	48.5	HLPLPL	689.9	63	β-CN f134-139
978.0	R-ST-P2, R-T-P2b	37.0	n.i.			
995.1	R-T-P2b	51.0	n.i.			
1005.0	R-T-P2b+c	54.1	VVAPFPEVF	1005.2	79	α _{s1} -CN24-32
1152.1	R-T-P2b+c	59.0	FVVAPFPEVF	1152.4	350	α _{s1} -CN23-32

1 ¹n.i. = no identificado en las secuencias usadas

2 ²Secuencia incierta

En cuanto a las fracciones P4, al contrario que para las anteriores, estaban compuestas básicamente por un solo componente, con un tiempo de retención de 28.5 min (Figura 8.9). Basándose en la alta absorbancia ultravioleta que presenta y en el elevado tiempo de retención en SEC y en RP-HPLC, es de esperar que el compuesto contenga triptófano (W) y/o tirosina (Y). Debido a que el tiempo de elución en RP-HPLC del componente de P4 es mayor

que el de W, y éste es el aminoácido más hidrofóbico y, por tanto, el que posee el mayor tiempo de elución (Parrot et al., 2003; Broncano et al., 2010), el compuesto de P4 debe ser un di o tripéptido que contiene al menos un aminoácido aromático. Este compuesto tiende a ser fragmentado durante el análisis LC-MS dando lugar a numerosas masas, las mayores fueron 368, 351, 159 y 144 m/z. Lo más probable es que se trate del dipéptido WY que se corresponde con f164-165 en α_{s1} -caseína, y que tiene una m/z de 368.2, cercana a los 368.3 m/z que fue determinada experimentalmente.

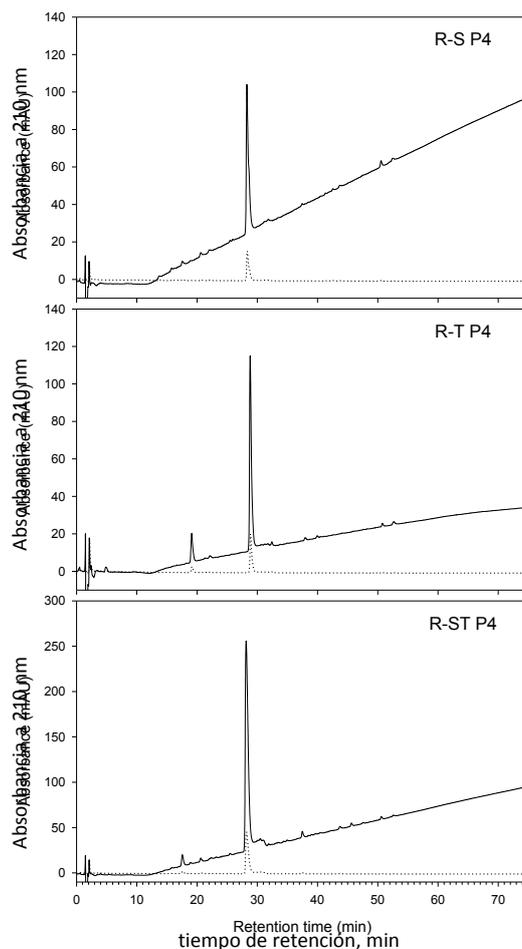


Figura 8.9. Perfiles peptídicos de las fracciones de P4 de la hidrolisis de retenido con subtilisina (R-S), tripsina (R-T) y su mezcla (R-ST), respectivamente.

Esto también encajaría con la pérdida de un grupo amino durante la fragmentación (Rogalewicz et al., 2010) dando señal a 351 m/z. Este dipéptido no ha sido identificado previamente en caseínas, pero se ajusta a los requerimientos estructurales del C-terminal para inhibidores ACE obtenidos mediante modelos de relación cuantitativa estructura-actividad (Quantitative structure–activity relationship, QSAR) (Wu et al., 2006). El péptido sintético ha

mostrado tanto actividad inhibidora de ACE como actividad antioxidante (Hernandez-Ledesma et al., 2007)

8.4. CONCLUSIONES

Los hidrolizados de caseínas de leche de cabra con tripsina y subtilisina presentan la mayor actividad inhibidora de ACE en las fracciones de tamaño molecular inferiores a 2.3 kDa con valores de IC_{50} comprendidos entre 5 y 57 $\mu\text{g/mL}$, lo que supone una actividad inhibidora cercana a la de algunos de los mejores inhibidores de ACE descritos en bibliografía. Algunos de los péptidos identificados en las fracciones activas, como TGIPN, LHLPLPL, HLPLPL y EMPFPK, coinciden con inhibidores de ACE identificados previamente por otros autores. El péptido WY es el único componente de una de las fracciones con mayor potencial inhibidor de ACE, que se identifica por primera vez en hidrolizados de caseínas.

9. Digestión simulada de péptidos inhibidores de ACE

9.1. PLANTEAMIENTO

Como se indicó en la “Introducción”, la actividad antihipertensiva de los péptidos inhibidores de ACE depende de su capacidad para permanecer activos hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Entre las modificaciones que pueden sufrir, el ataque de las enzimas digestivas es uno de los más importantes. En este capítulo se llevará a cabo la digestión simulada de los hidrolizados de retenido caracterizados en el capítulo anterior. El objetivo es comprobar cómo se ve afectada la actividad inhibidora tras el ataque de las enzimas digestivas.

9.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La digestión simulada es un proceso de hidrólisis con enzimas digestivas llevado a cabo en las condiciones más próximas a las que se dan en el organismo. El procedimiento se describe detalladamente en el apartado 4.8 de “Materiales y métodos”. El hidrolizado original ha sido digerido mediante dos estrategias para simular la digestión estomacal y la digestión completa (estómago e intestino), respectivamente. Las digestiones se han realizado en un reactor encamisado con agitación constante, la temperatura se fijó en 37 °C y los pH se han variado de acuerdo a la etapa de digestión que se pretendía simular, registrándose la evolución del pH a lo largo de las reacciones. Un total de 6 experimentos (3 sustratos x 2 tratamientos) han sido llevados a cabo, repitiendo cada uno de ellos por triplicado. Mediante un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) se ha determinado si existen diferencias significativas en la actividad inhibidora de las digestiones y el hidrolizado sin digerir. Seguidamente se ha establecido, mediante el método de la mínima diferencia significativa (LSD), qué digestión ha producido una variación en el poder inhibidor del hidrolizado original.

9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las digestiones gástricas el pH se mantuvo siempre constante (Figura 9.1), mientras que en las digestiones intestinales hubo mayores variaciones del pH (Figura 9.2). En estas se comenzó a registrar el pH en el momento que se añadió la enzima (pH 5.5) seguidamente el pH se elevó hasta 7.5 por la adición de NaOH 1M. Una vez alcanzado este pH se observó cómo, en todos los casos, se produjo un descenso inferior a 2 décimas en pH, sin embargo el pH volvió a subir muy suavemente hasta alcanzar pH 7.5 en la parte final.

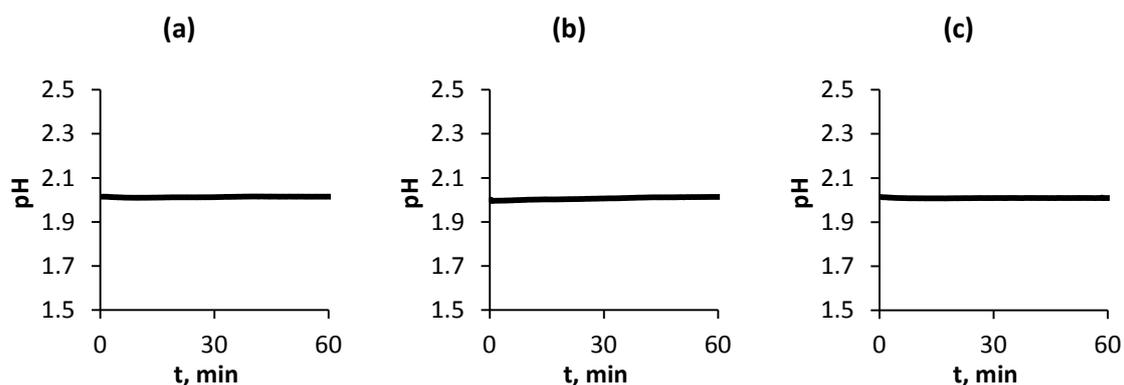


Figura 9.1. Evolución del pH durante la digestión estomacal de los hidrolizados de subtilisina (a), tripsina (b) y la mezcla de ambas (c).

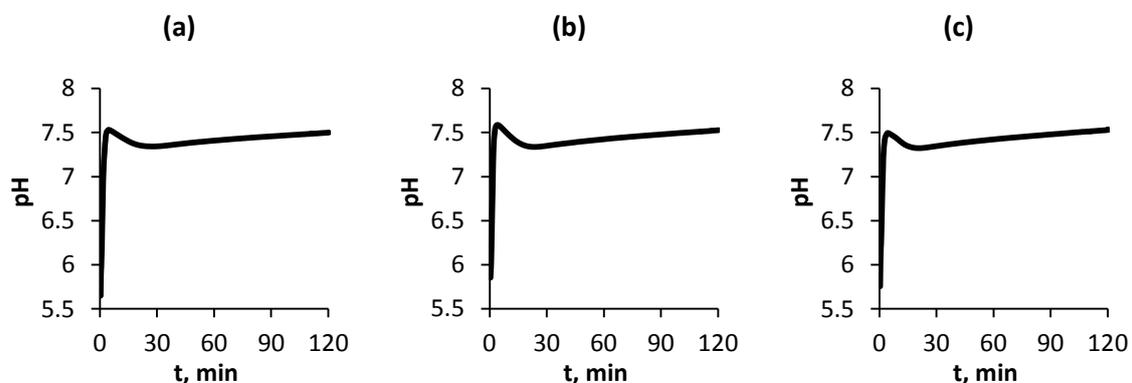


Figura 9.2. Evolución del pH durante la digestión completa de los hidrolizados de subtilisina (a), tripsina (b) y la mezcla de ambas (c).

Los valores medios de la actividad inhibidora de ACE de los hidrolizados, determinada tras ser sometidos a las digestiones, así como los valores de inhibición de ACE previos a la digestión, se presentan en la Figura 9.3. En todos los casos estudiados se observó como la digestión estomacal redujo ligeramente el valor IC_{50} del hidrolizado, lo que indicaría una mejora de la actividad inhibidora, ya que se necesitaría menor cantidad de hidrolizado para reducir la actividad de la enzima al 50 %. En cambio, la digestión completa empeoró ligeramente la actividad inhibidora para R-S y R-ST y supuso una pérdida importante (53 %) de poder inhibidor cuando la enzima empleada en la obtención del hidrolizado fue tripsina.

En el análisis ANOVA se asume la homogeneidad de las varianzas de los tratamientos. Para comprobar que esto es cierto se empleó el método de la F_{max} de Hartley. En la que se compara F_{max} tabulado para 2 grados de libertad y 3 tratamientos ($F_{max}=87.5$) con el valor de F_{max} calculado para cada muestra: 1.65, 59.39 y 23.38 para R-S, R-T y R-ST, respectivamente. Todos los valores calculados fueron menores que F_{max} tabulado, por tanto, no existieron diferencias

significativas entre las varianzas, cumpliéndose la condición necesaria para el análisis simple de la varianza.

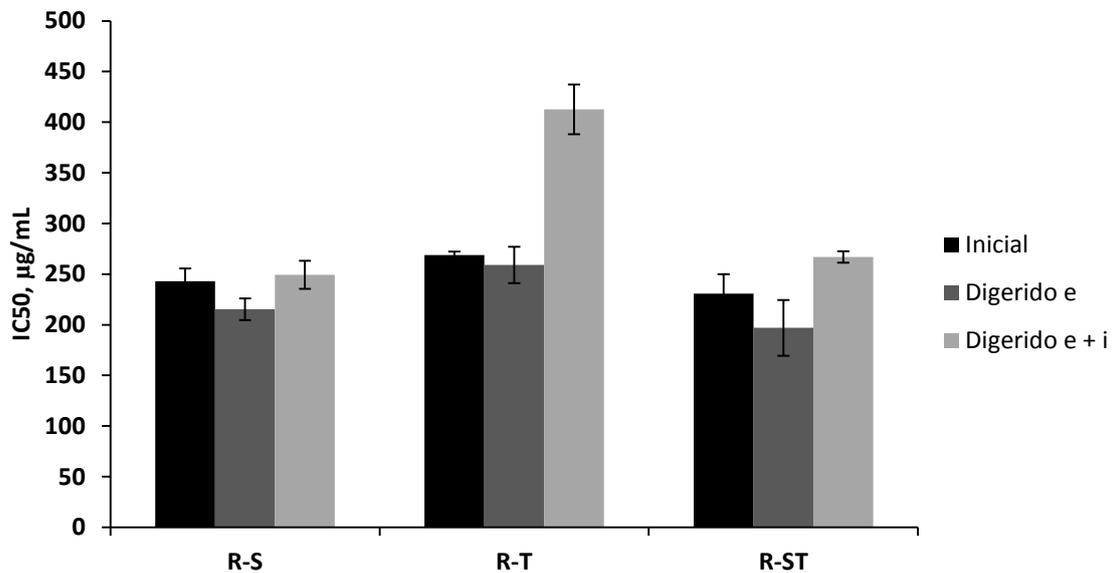


Figura 9.3. Valores de inhibición de ACE de los hidrolizados iniciales y de los sometidos a digestión estomacal (e) y completa (e+i).

En la Tabla 9.1 se presentan los resultados obtenidos del análisis de la varianza. El estadístico F tabulado para este caso, teniendo en cuenta que cada análisis se compone de 3 tratamientos con 3 repeticiones, tuvo un valor de 5.143. Como se observa, los valores de $F_{calculada}$ fueron siempre mayores que $F_{tabulada}$. Por lo tanto, en todos los casos, se rechazó la hipótesis de que las medias fueran iguales, es decir, existió una diferencia significativa en la actividad inhibidora de los hidrolizados digeridos respecto al inicial (sin digerir), como así lo reflejan los p-valores inferiores a 0.05.

Tabla 9.1. Análisis simple de la varianza para los hidrolizados iniciales y digeridos para cada uno de los tratamientos.

	Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad	Promedio cuadrados	F calculada	p-valor	F tabulada
R-S	Intragrupos	1974.25	2	987.12	6.416	0.032	5.143
	Intergrupos	923.07	6	153.85			
	Total	2897.32	8				
R-T	Intragrupos	44290.71	2	22145.35	70.839	> 0.01	5.143
	Intergrupos	1875.69	6	312.62			
	Total	46166.40	8				
R-ST	Intragrupos	7340.06	2	3670.03	9.452	0.014	5.143
	Intergrupos	2329.72	6	388.29			
	Total	9669.78	8				

Para determinar qué digestión altera la actividad de los inhibidores se empleó el método de la mínima diferencia significativa (LSD), que permite comparar las actividades de las digestiones (estomacal y completa) respecto de la del hidrolizado sin digerir. El resultado de este análisis se presenta en la Tabla 9.2 donde se muestra la mínima diferencia significativa (LSD) para un nivel de confianza del 95 %. Para que dos muestras sean estadísticamente significativas a ese nivel de confianza, la diferencia entre sus medias debe ser mayor que el LSD.

Tabla 9.2. Análisis de la mínima diferencia significativa entre los hidrolizados iniciales y digeridos.

Muestra	Contraste	Diferencias	Límite (5% LSD)	Sig. diferentes
R-S	Inicial – D. estomacal	-27.89	± 24.78	Si
	Inicial – D. completa	6.15	± 24.78	No
R-T	Inicial – D. estomacal	-9.84	± 35.32	No
	Inicial – D. completa	143.65	± 35.32	Si
R-ST	Inicial – D. estomacal	-33.74	± 39.37	No
	Inicial – D. completa	36.2	± 39.37	No

Aunque como se observó en la Figura 9.3, en todos los casos pudo apreciarse un aumento de la actividad inhibidora tras la digestión estomacal, sólo en el caso de R-S llegó a ser significativa. La pepsina degradaría algunos péptidos no activos o de actividad inhibidora baja, convirtiéndolos en péptidos activos, lo que haría disminuir el IC_{50} . En el caso del hidrolizado producido con tripsina la digestión completa provocó un descenso muy acusado en la actividad, aumentando en más del 50 % el valor de IC_{50} del hidrolizado inicial. Debido a que la digestión estomacal no generó un aumento significativo en la actividad inhibidora para los hidrolizados R-T, se podría asumir que la mayoría de la actividad inhibidora provenía de los péptidos que ya estaban en el hidrolizado original (R-T). Estos péptidos tendrían arginina o lisina en la última posición del C-terminal, que podrían ser liberados si el péptido fuese atacado por carboxipeptidasa A (exoenzima) durante la etapa de la digestión intestinal. Muy probablemente la modificación del tripéptido final de estos péptidos modificaría sustancialmente la capacidad inhibidora, de modo que se empeoraría la capacidad inhibidora de los mismos.

Por último, los valores IC_{50} determinados para las digestiones de hidrolizados R-ST no fueron estadísticamente distintos de los valores del hidrolizado original, lo que indicaría que la actividad inhibidora no se vio afectada por la digestión. Las variaciones detectadas en IC_{50} pudieron ser debidas a la degradación de algunos péptidos activos, sin embargo no fueron suficientes para disminuir considerablemente la actividad inhibidora.

9.4. CONCLUSIONES

La digestión gastrointestinal completa simulada no provoca pérdidas significativas de la actividad inhibidora del hidrolizado de la fracción proteica de caseínas de leche de cabra cuando la enzima utilizada es subtilisina o la mezcla subtilisina y tripsina. Sin embargo se han detectado pérdidas superiores al 50% en dicha actividad cuando la enzima utilizada es tripsina.

10. Purificación de péptidos inhibidores de ACE con membranas

10.1. PLANTEAMIENTO

Los péptidos inhibidores de ACE generados durante los procesos de hidrólisis forman parte de una mezcla muy compleja de péptidos, muchos de los cuales no poseen actividad inhibidora. Por tanto, sería deseable llevar a cabo una etapa de purificación con el objetivo de separar los péptidos con buena actividad de aquellos inactivos. Entre las posibles alternativas descritas en el apartado 2.4.1 de la “Introducción”, en este trabajo se ha seleccionado la filtración tangencial. Este tipo de separación es la más adecuada para la purificación de nutracéuticos, debido, fundamentalmente, a razones económicas. Además el uso de membranas cerámicas presenta ventajas frente a las orgánicas, como también se ha sido indicado en este trabajo.

Debido a los buenos resultados de inhibición de ACE y resistencia a la digestión obtenidos, el hidrolizado de retenido producido con subtilisina y tripsina conjuntamente (R-ST) ha sido seleccionado para estudiar el proceso de purificación. Además, basándose en los resultados del análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión de tamaños en el capítulo 8, la máxima actividad de los hidrolizados se concentra en la fracción de tamaño inferior a 1.7 kDa. Para el estudio de la purificación de péptidos se plantearán inicialmente dos estrategias de filtración consistentes en dos filtraciones en serie con distintos tamaños de corte. La primera etapa consistirá en una filtración por un tamaño de corte superior al límite establecido por las fracciones activas (1.7 kDa) con el objetivo de eliminar todos los péptidos de mayor tamaño. Para la segunda etapa se seleccionará un tamaño de corte que permita concentrar los péptidos activos de pequeño tamaño.

Para cada filtración se estudiará cómo mejora la actividad inhibidora de las fracciones (filtrado y retenido) obtenidas así como las pérdidas de flujo de las membranas y su recuperación tras la limpieza.

10.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Mediante una etapa previa de microfiltración (0.14 μ m), como la realizada en el capítulo 6, se ha obtenido la fracción caseínica a partir de leche de cabra desnatada. El volumen necesario para las filtraciones del estudio (>2 L), ha hecho necesario el empleo de un dispositivo diferente al que se había utilizado hasta el momento para la hidrólisis (montaje “B” del epígrafe 4.3). La principal novedad es que el tanque de reacción se sumerge en un baño termostático. La hidrólisis se ha realizado con la mezcla de subtilisina y tripsina,

manteniendo las condiciones de operación descritas en el capítulo 7: 3 h de reacción, 50 °C y unas concentraciones de enzima de 5 g/L para subtilisina y tripsina.

El hidrolizado de caseínas producido se ha sometido a un proceso de filtración en serie a través de dos membranas cerámicas tubulares. Es decir, como alimentación de la segunda etapa de filtración, se ha empleado el filtrado de la primera etapa. El dispositivo utilizado para cada etapa de filtración ha sido el detallado en el apartado 4.2.2. Previo a cada una de las filtraciones, la membrana se ha sometido a un acondicionamiento consistente en circular agua durante 1 h en recirculación total y en las mismas condiciones de temperatura, velocidad de circulación y presión transmembrana (ΔP) de la filtración. Las dos alternativas estudiadas han sido:

- I. El hidrolizado ha sido filtrado en primer lugar por una membrana de 50 kDa (TAMI, France) a 50 °C, con un caudal de 400 L/h (3.3 m/s) y una ΔP de 1 bar. Se ha operado en modo de concentración hasta alcanzar un factor de concentración de 3. El filtrado obtenido en esta primera etapa se ha ultrafiltrado de nuevo a través de una membrana de 3 kDa (TAMI, France). En este caso la membrana tenía un solo canal, por lo que el caudal empleado ha sido de 335 L/h, manteniéndose la temperatura a 50 °C. El tiempo de operación está limitado tanto por el ensuciamiento, se deben evitar caídas de flujo mayores del 70 %, como por el peligro de crecimiento bacteriano en el producto, limitándose el tiempo de operación a 10 h.
- II. El procedimiento ha sido exactamente igual que el anterior, pero utilizando una membrana de 15 kDa en la primera etapa de filtración.

Durante cada una de las etapas, se ha hecho un seguimiento del flujo de filtrado como se indica en apartado 4.2.2. Después de cada etapa de filtración, la membrana se ha sometido a un proceso de limpieza (apartado 4.2.4) determinando posteriormente la eficacia de la misma de acuerdo a la ecuación (4.12). La actividad inhibidora de la alimentación, así como de las corrientes de salida han sido evaluadas mediante el ensayo espectrofotométrico descrito en el apartado 4.4.1.

10.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo las ultrafiltraciones de este capítulo se empleó el hidrolizado obtenido a partir de 2 L de la fracción proteica de caseínas con la mezcla de proteasas subtilisina + tripsina. Los resultados de esta hidrólisis fueron muy similares a los obtenidos previamente para el mismo tipo de hidrólisis llevada a cabo en el reactor de 250 mL (capítulo 7). De hecho,

las curvas de hidrólisis de ambas reacciones (Figura 10.1) fueron prácticamente idénticas, alcanzando grados de hidrólisis muy similares: 32.5 % y 31.4 % para la hidrólisis reactor encamisado (dispositivo A) y recipiente en baño (dispositivo B), respectivamente.

En este caso, el índice IC_{50} para el hidrolizado fue de 218.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor que no difiere del obtenido para la hidrólisis llevada a cabo en el reactor encamisado, 230.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por tanto, se puede asumir que las diferencias entre los hidrolizado R-ST producidos con los dos dispositivos experimentales fueron despreciables.

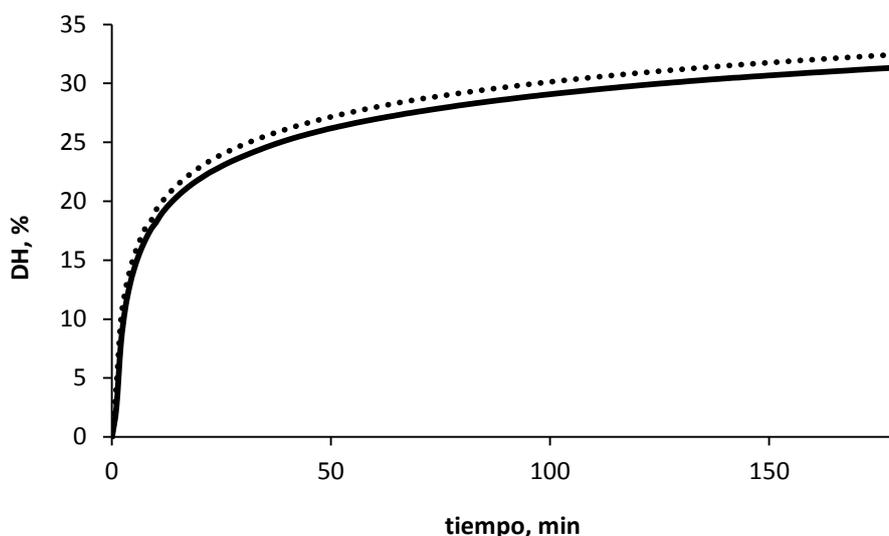


Figura 10.1. Evolución de DH para la hidrólisis de retenido con la combinación de subtilisina y tripsina en dispositivo de hidrólisis A (línea de puntos) y B (línea continua).

Los resultados obtenidos para las dos estrategias de purificación/concentración por membranas planteadas se discuten paralelamente a lo largo del capítulo.

10.3.1. Evolución del flujo de permeado

En la Figura 10.2 y Figura 10.3 se muestra la evolución del flujo de permeado para cada una de las etapas que componen las estrategias planteadas. En todos los casos se observa que el flujo descendió con el tiempo y, aunque la velocidad de descenso se fue reduciendo, en ningún caso se alcanzó un valor estacionario dentro del periodo de operación. Para las primeras etapas de ambas estrategias (filtraciones de 50 y 15 kDa) se alcanzó el factor de concentración 3. Sin embargo, en las segundas etapas (3 kDa) no fue posible alcanzar factores de concentración altos y, tras un tiempo de filtración de aproximadamente 10 h, se detuvo la operación.

En el primer planteamiento propuesto (Figura 10.2), la membrana de 50 kDa sufrió una pérdida de flujo de $11.56 \cdot 10^{-3}$ a $4.59 \cdot 10^{-3}$ $\text{Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ durante las 5.2 h de operación, lo que supuso un descenso del flujo del 60.3 %. Para la etapa de 3 kDa la pérdida de flujo fue menos acusada (38.8 %), alcanzando un flujo final de $0.791 \cdot 10^{-3}$ $\text{Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ transcurridas 10.2 h de operación.

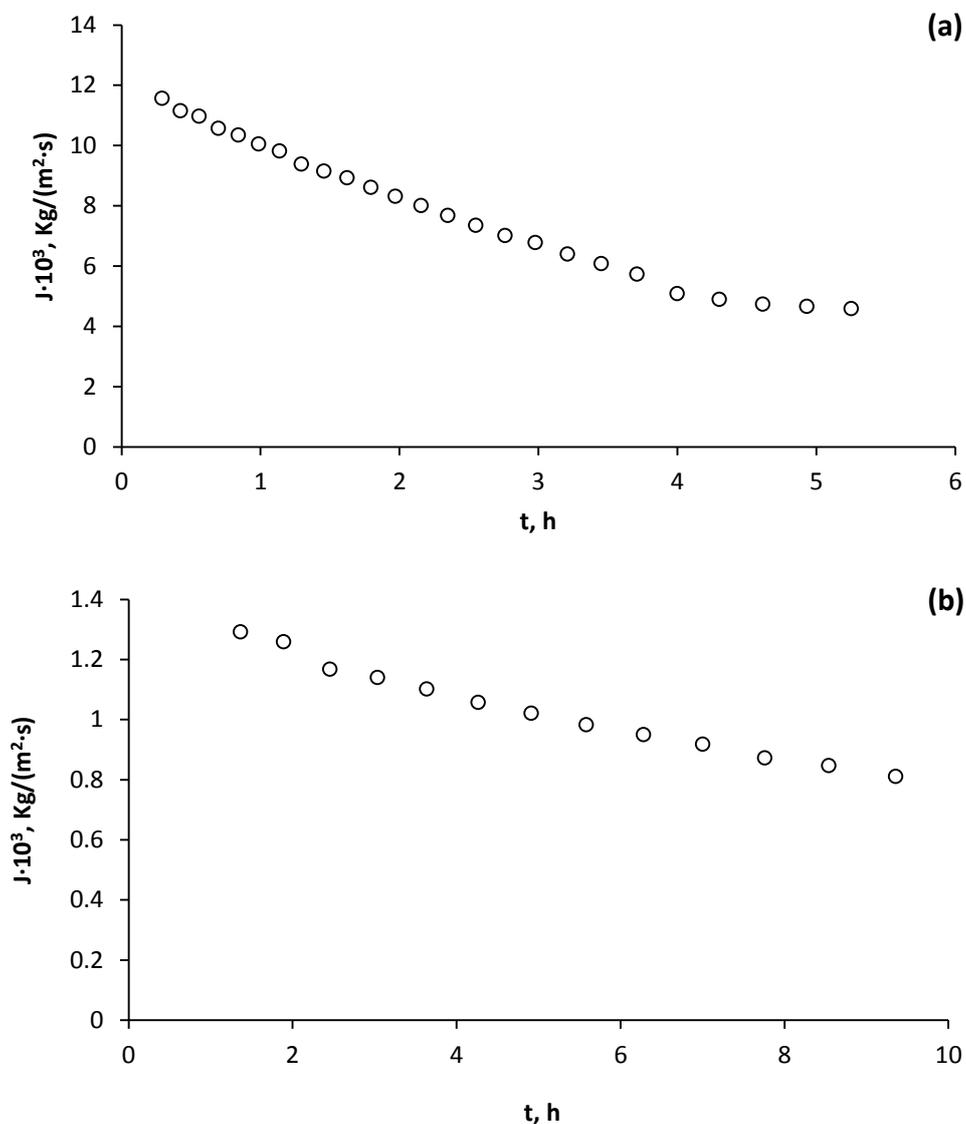


Figura 10.2. Evolución del flujo de filtrado para las dos etapas de la estrategia I: filtración inicial por 50 kDa (a) y segunda etapa de filtración de 3 kDa (b).

Para la estrategia II, la membrana de la primera etapa (15 kDa) tuvo una pérdida de flujo del 51.5 %, pasando de $7.33 \cdot 10^{-3}$ a $3.55 \cdot 10^{-3}$ $\text{Kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Este descenso fue algo inferior al de la membrana de 50 kDa usada en la primera estrategia. El tiempo para alcanzar el factor de concentración deseado ($\text{FC} = 3$) fue 5.8 h, algo más largo que en el caso anterior. El comportamiento del flujo en la etapa de filtración a través de 3 kDa fue muy parecido al de la

primera estrategia, se detectó una caída de flujo del 37.3 % en las 10.2 h que se prolongó la filtración.

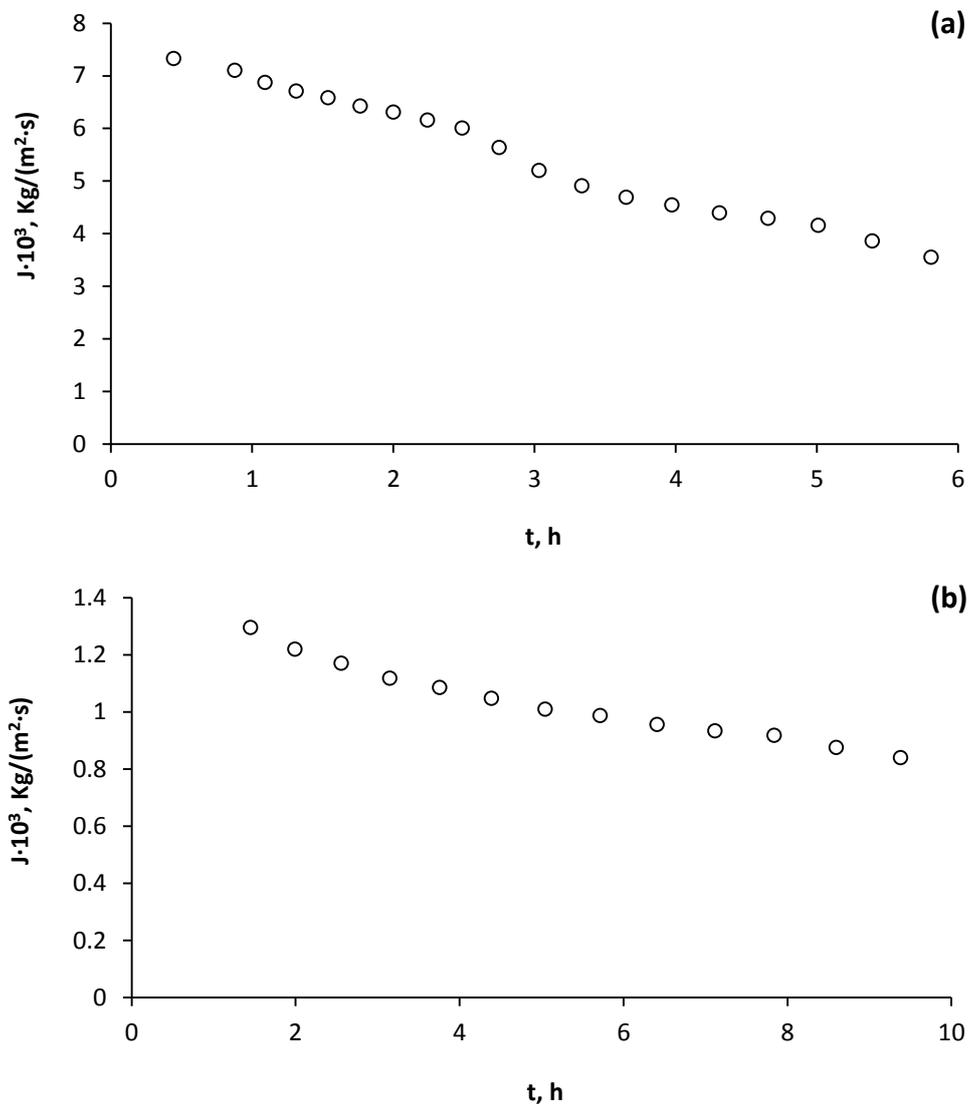


Figura 10.3. Evolución del flujo de filtrado para las dos etapas de la estrategia II: filtración inicial por 15 kDa (a) y segunda etapa de filtración de 3 kDa (b).

Los datos experimentales fueron ajustados por regresión no lineal a distintos modelos de bloqueo de poro: bloqueo completo, bloqueo interno, bloqueo parcial y de torta de filtrado. En la Figura 10.4 y Figura 10.5 se muestran los ajustes para las membranas de 50 kDa y 3 kDa, respectivamente, ambas correspondientes a la primera estrategia propuesta. Mientras que los ajustes de las membranas de la segunda estrategia (15 kDa y 3kDa) se representan en la Figura 10.6 y Figura 10.7. En cada una de ellas los datos experimentales son representados por puntos y el ajuste se corresponde con la línea de color negro.

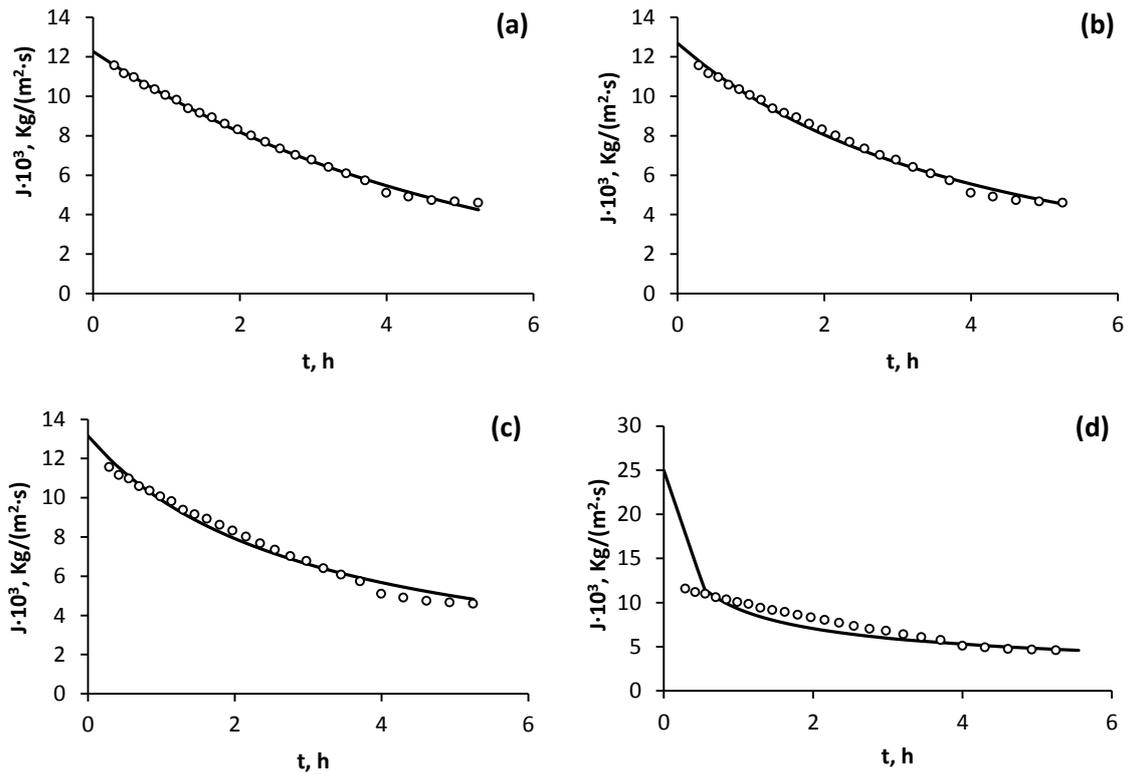


Figura 10.4. Ajuste a modelo de bloqueo de poro completo (a), interno (b), parcial (c) y de torta (d) para membrana 50 kDa (estrategia I). Datos experimentales (○), modelo ajustado (—).

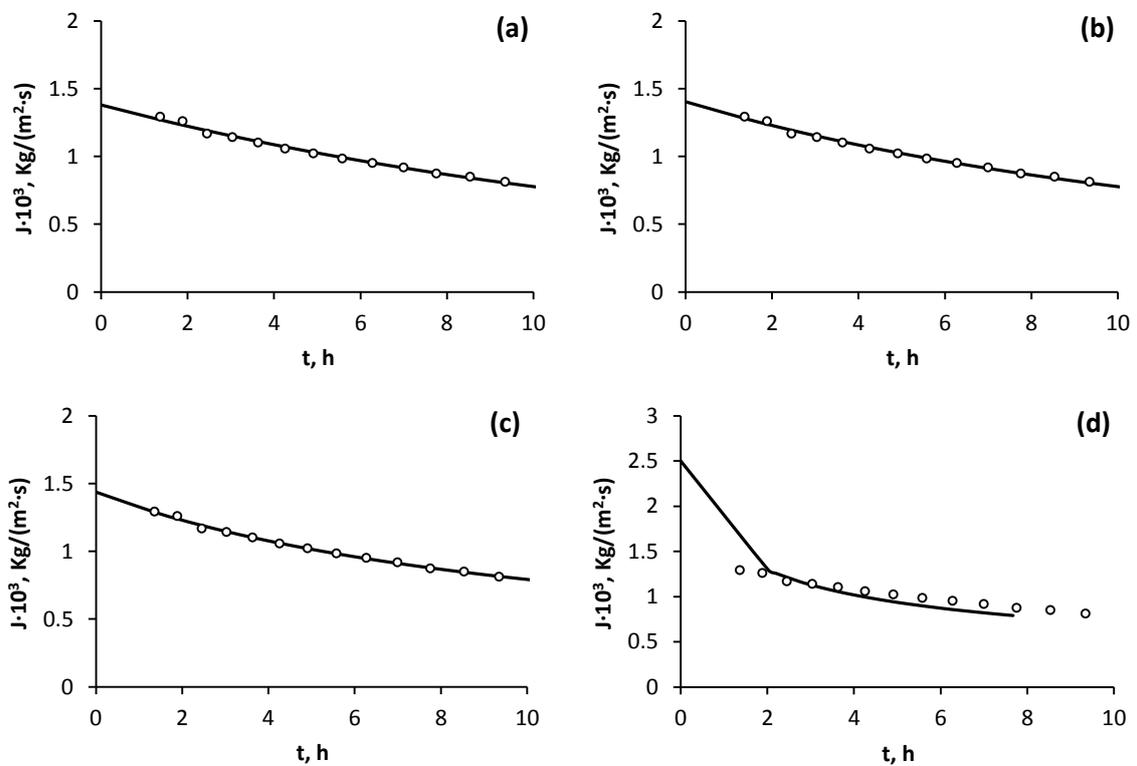


Figura 10.5. Ajuste a modelo de bloqueo de poro completo (a), interno (b), parcial (c) y de torta (d) para membrana 3 kDa (estrategia I). Datos experimentales (○), modelo ajustado (—).

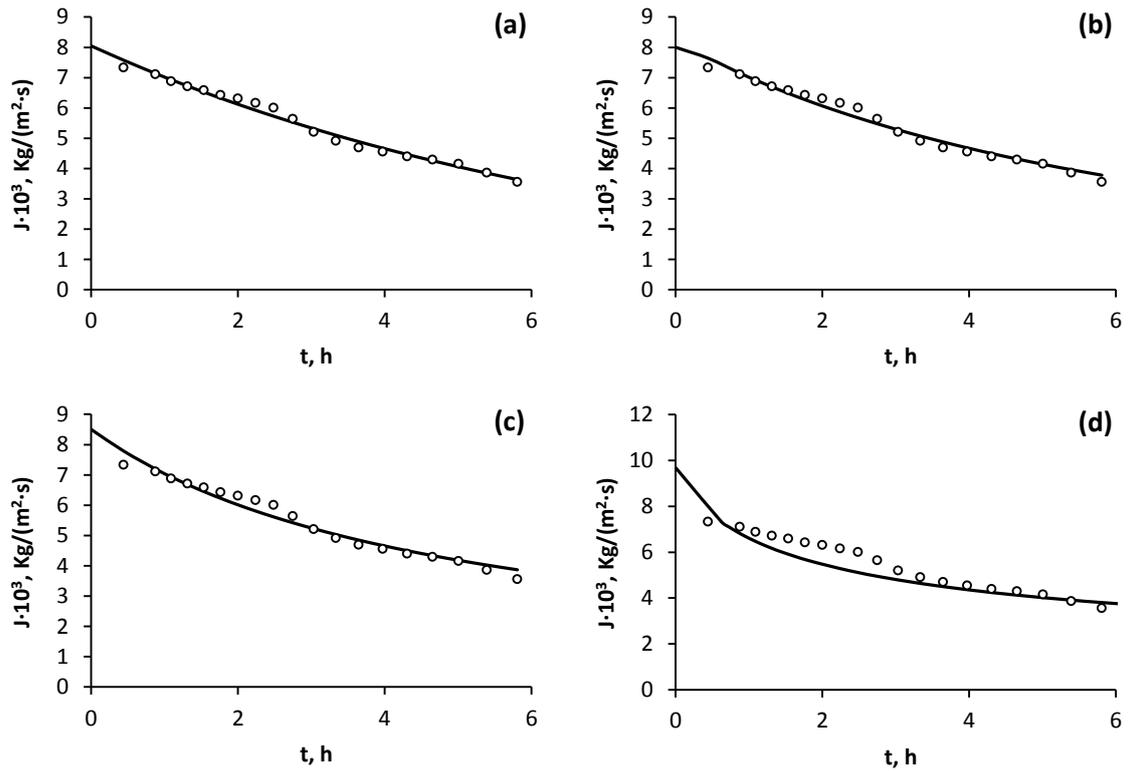


Figura 10.6. Ajuste a modelo de bloqueo de poro completo (a), interno (b), parcial (c) y de torta (d) para membrana 15 kDa (estrategia II). Datos experimentales (\circ), modelo ajustado (—).

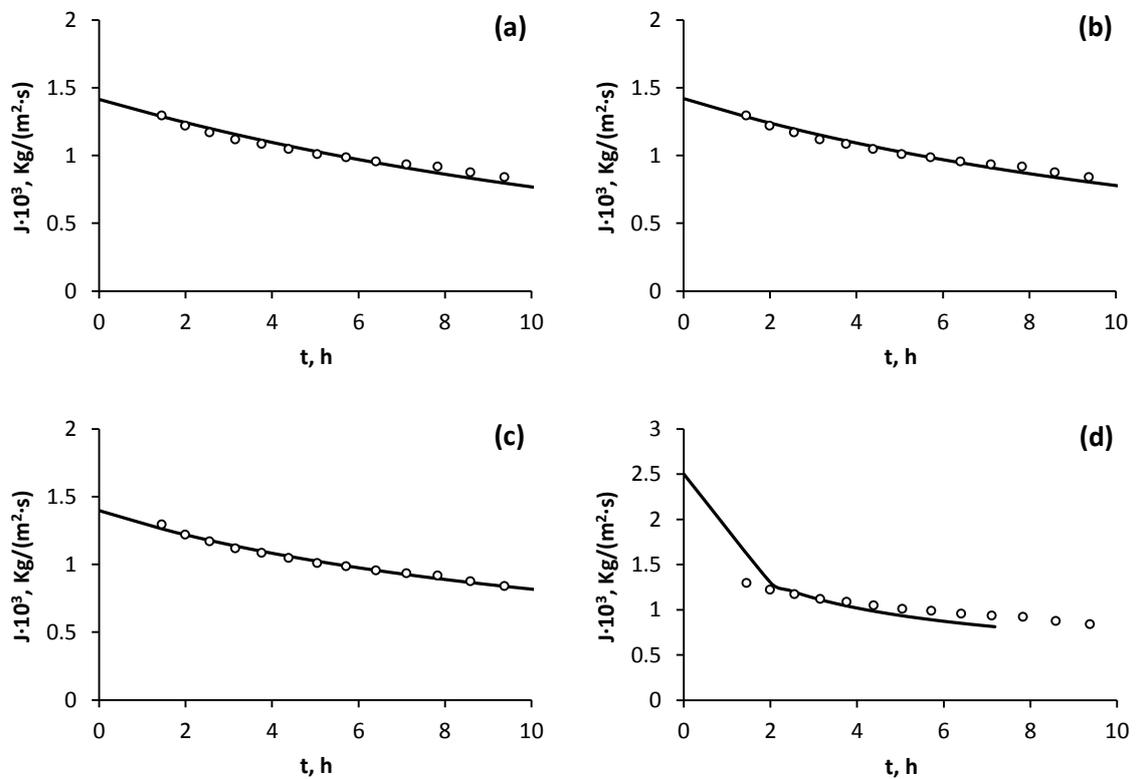


Figura 10.7. Ajuste a modelo de bloqueo de poro completo (a), interno (b), parcial (c) y de torta (d) para membrana 3 kDa (estrategia II). Datos experimentales (\circ), modelo ajustado (—).

Los datos de flujo observados fueron correctamente ajustados a los distintos modelos matemáticos, tan sólo en el caso de la filtración en la membrana de 3 kDa no fue posible ajustar los datos al modelo de torta de filtrado. Los parámetros de ajuste de los modelos para las membranas de la estrategia I se presentan en la Tabla 10.1. Junto con estos valores se obtiene el coeficiente de correlación que determina la bondad del ajuste.

Para la membrana de 50 kDa el mejor ajuste se obtuvo para el modelo de bloqueo completo de poro. El ajuste al modelo de formación de torta es el más débil, obteniéndose un valor de flujo inicial muy alto.

Para la membrana de 3 kDa no fue posible ajustar los datos al modelo de formación de torta, lo que es lógico si tenemos en cuenta el pequeño tamaño de los solutos. Por este motivo, los valores de los parámetros que aparecen en la Tabla 10.1 son algunos de los valores iniciales ensayados para ajustar el modelo. Para el resto de modelos se obtuvieron buenos ajustes, destacando el modelo de bloqueo parcial.

Tabla 10.1. Parámetros estimados para modelos de ensuciamiento de las membranas empleadas en la estrategia I.

Etapa	Modelo	$J_0 \cdot 10^3,$ $Kg/(m^2 \cdot s)$	$J_{lim} \cdot 10^3,$ $Kg/(m^2 \cdot s)$	$k_2 \cdot 10^5,$ s^{-1}	$K_s',$ $(kg \cdot s)^{0.5}$	$k_1 \cdot 10^3,$ $(m^2 \cdot s^2)/kg$	k_0, s^{-1}	R^2
50 kDa	Completo	12.26	0.04	5.64				0.9966
	Interno	12.68			23.41			0.9926
	Parcial	13.14	0.15			7.08		0.9818
	F. Torta	24.96	0.44				2.13	0.9307
3 kDa	Completo	1.38	0.19	1.97				0.9915
	Interno	1.40			0.008			0.9939
	Parcial	1.44	0.14			18.21		0.9967
	F. Torta*	2.50	0.009				40	-

Los parámetros de ajuste de los modelos para las membranas empleadas en la segunda estrategia propuesta, se presentan en la Tabla 10.2. Al igual que en la primera etapa de la estrategia I, los mejores resultados para la membrana de 15 kDa se obtuvieron para los modelos de bloqueo completo e interno. De hecho, el mejor ajuste para la primera etapa fue el de bloqueo completo, con un $R^2 = 0.9850$. Para este modelo el parámetro $J_{lim} = 0$, es decir la membrana se colmataría progresivamente hasta reducir su flujo a 0.

Los resultados obtenidos para la membrana de 3 kDa de la segunda estrategia son prácticamente los mismos que los obtenidos para la estrategia anterior. Sólo destacar que el ajuste en este caso resultó algo menos exacto para los modelos de bloqueo completo y bloqueo interno. El modelo de bloqueo parcial es el que mejor ajustó el sistema con unos parámetros muy similares a los encontrados para la filtración de 3 kDa de la estrategia I. El modelo de formación de torta puede ser descartado, ya que no fue posible obtener una solución que ajuste el modelo.

Tabla 10.2. Parámetros estimados para modelos de ensuciamiento en las membranas empleadas en la estrategia II.

Etapa	Modelo	$J_0 \cdot 10^3,$ $Kg/(m^2 \cdot s)$	$J_{lim} \cdot 10^3,$ $Kg/(m^2 \cdot s)$	$k_2 \cdot 10^5,$ s^{-1}	$K_s',$ $(kg \cdot s)^{-0.5}$	$k_1 \cdot 10^3,$ $(m^2 \cdot s^2)/kg$	$k_0,$ s^{-1}	R^2
15 kDa	Completo	8.03	0	3.80				0.9849
	Interno	8.21			0.005			0.9784
	Parcial	8.50	0.08			6.83		0.9660
	F. Torta	9.68	0.06				2.04	0.9353
3 kDa	Completo	1.41	0.19	2.09				0.9838
	Interno	1.42			0.008			0.9868
	Parcial	1.40	0.14			16.32		0.9906
	F. Torta*	2.50	0.009				40	-

Muy probablemente tanto bloqueo completo como el bloqueo interno ocurran durante las filtraciones. Sin embargo para las primeras etapas (50 kDa y 15 kDa), debido a la presencia de moléculas de mayor tamaño en la alimentación, el mecanismo predominante fue el de bloqueo completo de poro. Los valores para el flujo inicial de permeado (J_0) son coherentes con el flujo observado y la permeabilidad de cada membrana. El flujo límite obtenido para el modelo de bloqueo completo para ambas membranas fue muy pequeño o nulo, lo que indica que la membrana podría seguir operando hasta bloquear todos los poros sin llegar a alcanzar un estado estacionario. De acuerdo con el parámetro k_2 , la “velocidad” de ensuciamiento fue mayor para la membrana de 50 kDa que para la membrana de 15 kDa. Este hecho se confirma por la mayor caída de flujo registrada para la membrana de 50 kDa durante el mismo tiempo de operación.

Por otro lado, en la segunda etapa (3 kDa) de cada estrategia, el modelo que mejor explicó el comportamiento fue el de bloqueo parcial. Debido al menor tamaño de corte de la membrana,

los péptidos no bloquearían permanentemente a los poros y se produciría una dinámica de bloqueo-desbloqueo durante la filtración. Un sistema responde a este modelo cuando los tamaños de soluto y poro son similares. En este caso, como se destacó en capítulos anteriores, muchos de los péptidos obtenidos en los hidrolizados tenían tamaños inferiores a 1.7 kDa, por lo que tras eliminar los solutos de mayor tamaño en la primera etapa (50 o 15 kDa), los tamaños moleculares de los solutos presentes serían similares al tamaño de los poros. De acuerdo con los datos obtenidos, para estas filtraciones sí se alcanzaría un J_{lim} y por tanto el estado estacionario en el que no se produciría más ensuciamiento. En la operación de filtrado a través de 3 kDa se obtuvieron, en la parte final de la filtración, flujos cercanos a este flujo límite.

10.3.2. Estudio de la etapa de limpieza

Una vez finalizadas cada una de las etapas de filtración se procedió a limpiar la membrana. El objetivo de la etapa de limpieza es eliminar el “fouling” o ensuciamiento generado durante la filtración de forma que la membrana vuelva a tener características filtrantes similares a las que tenía antes de la filtración. En la Figura 10.8 y Figura 10.9 se representan los flujos de filtrado para distintos valores de presión transmembrana obtenidos para las membranas de la estrategia I y II, respectivamente. En cada gráfica se representan los valores de flujo para la membrana sucia (o) y después de la limpieza (▲). La pendiente de estas rectas sería la permeabilidad de la membrana en cada caso.

Para la estrategia I (Figura 10.8), la permeabilidad de la membrana aumentó tras la limpieza, volviendo a un valor muy parecido al que tenía la membrana antes de la filtración (línea discontinua). Los valores de permeabilidad obtenidos después de la limpieza fueron 0.1208 y 0.0238 Kg/(m²·s·bar) para las membranas de 50 y 3 kDa, respectivamente. En el caso de la estrategia II, el comportamiento fue muy similar, la etapa de limpieza consiguió eliminar la suciedad depositada durante la filtración de modo que las líneas de calibración para la membrana virgen y para la membrana después de la limpieza están prácticamente superpuestas, obteniéndose permeabilidades de 0.0420 y 0.0238 Kg/(m²·s·bar para membranas de 15 y 3 kDa, respectivamente.

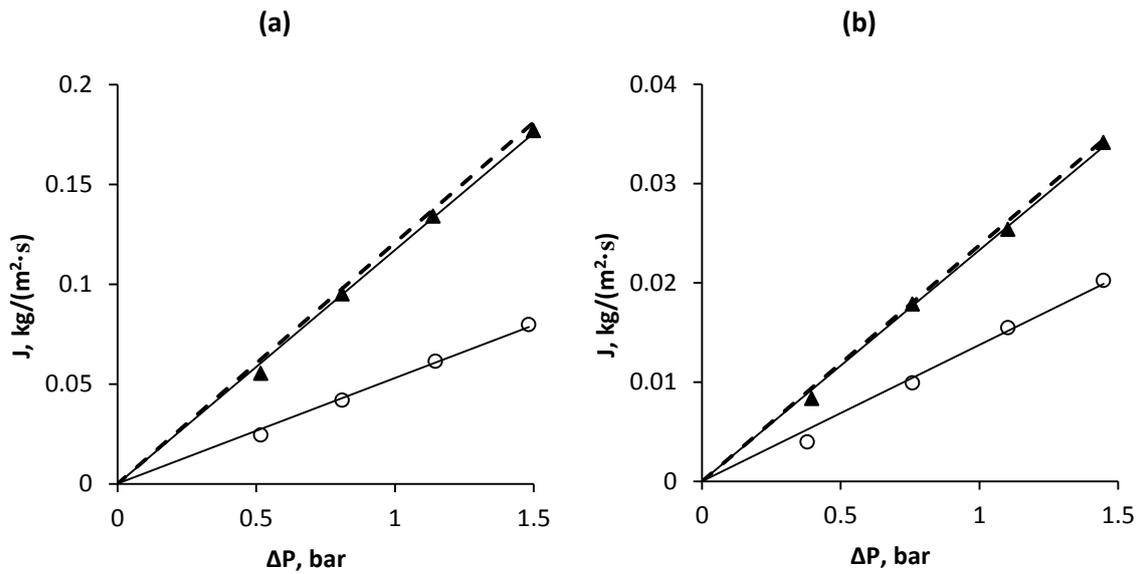


Figura 10.8. Flujo de agua frente a presión transmembrana para las etapas de la estrategia I: 50 kDa (a) y 3 kDa (b). Flujo antes de limpieza (\circ), después de la limpieza (\blacktriangle) y permeabilidad de membrana virgen (línea discontinua).

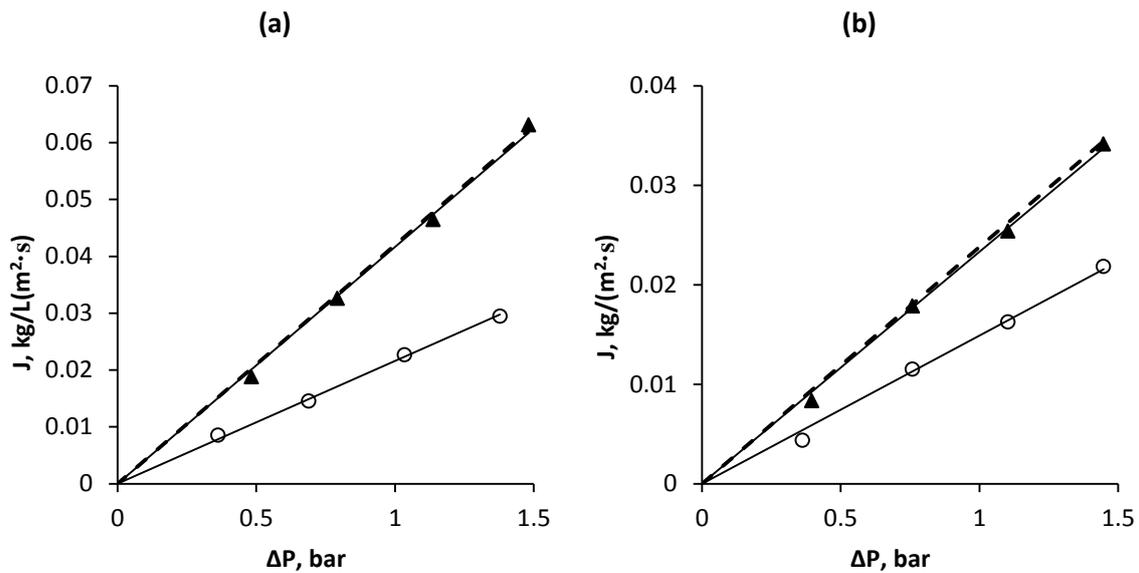


Figura 10.9. Flujo de agua frente a presión transmembrana para las etapas de la estrategia II: 15 kDa (a) y 3 kDa (b). Flujo antes de limpieza (\circ), después de la limpieza (\blacktriangle) y permeabilidad de membrana virgen (línea discontinua).

En la Tabla 10.3 se presentan las resistencias total (R_T) y de ensuciamiento (R_F) de las membranas utilizadas en el estudio. Para cada membrana se determinó la resistencia inicial (membrana virgen), la resistencia de la membrana después de la filtración (membrana sucia) y la resultante después de la limpieza con álcali (membrana limpia). Esto permitió evaluar la eficiencia del tratamiento de limpieza (E).

Tabla 10.3. Resistencias e índices de eficiencia de limpieza para las membranas ensayadas.

Estrategia	Membrana	A_F, m^2	Etapas	R_T ($m^2 \cdot s \cdot bar/kg$)	R_F ($m^2 \cdot s \cdot bar/kg$)	E, %
I	50 kDa	0.0094	Inicial	8.2761	0	97
			Post- filtración	18.8608	10.5847	
			NaOH	8.5334	0.2573	
	3 kDa	0.0042	Inicial	42.0441	0	97
			Post- filtración	72.7811	30.7370	
			NaOH	42.9138	0.8698	
II	15 kDa	0.0094	Inicial	23.8112	0	99
			Post- filtración	46.3632	22.5520	
			NaOH	24.0042	0.1930	
	3 kDa	0.0042	Inicial	42.0441	0	96
			Post- filtración	67.1533	25.1093	
			NaOH	42.9138	0.8698	

De acuerdo con los índices de eficacia obtenidos (Tabla 10.3), el procedimiento de limpieza ensayado fue eficiente, lo que permitió recuperar la permeabilidad de las membranas, en todos los casos con valores de eficacia superiores al 95 %. Las menores recuperaciones se detectaron en las membranas de 3 kDa ya que, debido a su pequeño tamaño de poro, los depósitos formados son más difíciles de extraer. Los resultados obtenidos en este trabajo están en la misma línea que los obtenidos por Barlett et al. (1995), quienes establecieron que el tratamiento con NaOH resultaba efectivo para recuperar membranas cerámicas tras la filtración de leche. Esta capacidad de limpieza se atribuyó a la capacidad de la solución alcalina de solubilizar los depósitos de proteína.

10.3.3. Actividad inhibidora de ACE de las fracciones

Para determinar cómo afectan las filtraciones a la actividad inhibidora de ACE, se determinó el tanto por ciento de variación del parámetro IC_{50} de cada una de las corrientes obtenidas (retenido y filtrado) al final del proceso respecto del IC_{50} de la alimentación. Las variaciones negativas indicarían un descenso del IC_{50} y por tanto, una mejora en la inhibición de ACE respecto a la alimentación. En la Tabla 10.4 aparecen los porcentajes de mejora para cada una de las etapas ensayadas, así como la concentración proteica de cada fracción.

Tabla 10.4. Contenido en proteína y mejora de la actividad inhibidora de las fracciones obtenidas en cada etapa de filtración.

Estrategia	Membrana	Corriente	Proteína (g/L)	Variación en IC ₅₀
I	50 kDa	Alimentación	43.97	
		Retenido	73.80	100.2%
		Filtrado	27.16	-30.7%
	3 kDa	Alimentación	27.16	
		Retenido	27.77	27.9%
		Filtrado	30.32	3.4%
II	15 kDa	Alimentación	41.71	
		Retenido	72.77	88.3%
		Filtrado	33.07	-15.7%
	3 kDa	Alimentación	33.07	
		Retenido	36.95	27.4%
		Filtrado	32.66	-2.9%

Atendiendo a los datos de proteína obtenidos, las primeras etapas de ambas estrategias (50 y 15 kDa) produjeron un retenido con una concentración alta de proteína. Sin embargo, la proteína concentrada en estas fracciones tuvo una actividad inhibidora menor que la del hidrolizado inicial, ya que el IC₅₀ sufrió incrementos del 100 % y el 88 %, respectivamente. Es decir, los péptidos presentes en el retenido requieren concentraciones mayores para inhibir la actividad de ACE al 50 %. El enriquecimiento en péptidos de mayor tamaño con poca actividad inhibidora en el retenido explicaría este comportamiento. Por el contrario, las fracciones del filtrado, a pesar de no tener una concentración en proteína elevada, presentaron unos valores de IC₅₀ un 30 % (filtrado 50 kDa) y un 15 % (filtrado 15 kDa) menores que los de la alimentación, lo que supone una purificación considerable de los péptidos activos.

La filtración del filtrado obtenido en la primera etapa a través de una membrana de 3 kDa no proporcionó una mejora apreciable en la capacidad inhibidora de las fracciones. Esto pudo ser debido a que los pequeños péptidos activos que contenía la alimentación de esta segunda etapa, fueron capaces de atravesar la membrana, manteniendo la actividad inhibidora a ambos lados de la membrana.

Otro de los problemas que se detectaron fue que a la presión de trabajo (1 bar) no fue posible alcanzar factores de concentración altos, ya que el flujo de filtrado era muy pequeño y tras 10 h de operación se alcanzó un factor de concentración de 1.2. Este factor de concentración bajo pudo influir en que no se observaran diferencias apreciables entre las etapas de 3 kDa de las dos estrategias.

Por tanto, para la purificación de los péptidos activos la mejor opción sería una filtración a través de 50 kDa que mejoraría un 30 % la actividad inhibidora. Una segunda filtración consecutiva a través de 3 kDa no produce una mejora suficiente. El filtrado obtenido en la filtración de 50 kDa puede ser concentrado por evaporación o bien empleando una etapa de nanofiltración que eliminaría agua e iones monovalentes como Na^+ mientras que los péptidos activos se concentrarían en el retenido. El producto concentrado podría ser estabilizado mediante secado por atomización.

10.4. CONCLUSIONES

La filtración tangencial con membranas cerámicas de 50 kDa de la fracción proteica de caseínas de leche de cabra hidrolizada con una mezcla de subtilisina y tripsina, responde al modelo de colmatación de bloqueo completo de poro. Esta filtración es un método adecuado para la purificación de péptidos inhibidores de ACE, ya que logra obtener mejoras en la capacidad inhibidora (IC_{50}) del 30 % para factores de concentración de 3. Sin embargo, una segunda etapa de filtración mediante membranas de 3 kDa no mejora los resultados obtenidos. Las características filtrantes de las membranas utilizadas se recuperan al 97% mediante limpieza alcalina en condiciones standard.

11. Secado por atomización de péptidos inhibidores de ACE

11.1. PLANTEAMIENTO

El secado del hidrolizado proporciona ventajas interesantes para la comercialización del producto. Por un lado al eliminar la mayor parte del agua, aumenta la estabilidad del producto frente a la proliferación de microorganismos, evitando en la mayoría de los casos la necesidad de refrigeración del producto. A su vez, se reducen los costes de almacenamiento y transporte tanto por la disminución de volumen como por las ventajas de trabajar con sólidos en lugar de con líquidos.

En este capítulo se estudiará la estabilización de los hidrolizados bioactivos mediante el secado por atomización. Para ello se determinará cómo influyen dos de los parámetros más importantes en este tipo de secado, la temperatura de entrada del aire (T) y el caudal de alimentación (Q), sobre distintas variables de salida como temperatura de salida (Ts), rendimiento (R), humedad (H) y actividad inhibidora de ACE (IC_{50}). Mediante el ajuste a modelos matemáticos es posible optimizar cada una de estas variables.

11.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Al igual que en el estudio de purificación de péptidos activos, el hidrolizado seleccionado para estos experimentos ha sido el producido a partir de la fracción proteica de caseínas con la combinación de subtilisina y tripsina. Como se detalló previamente, el retenido obtenido mediante ultrafiltración por membrana de $0.14\ \mu\text{m}$ (capítulo 6), se ha hidrolizado con subtilisina y tripsina (5 g/L) durante 3 h de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.3. El hidrolizado necesario (2L), se ha generado en un solo experimento, una vez producido se ha conservado a $4\ ^\circ\text{C}$ hasta completar todos los experimentos de secado.

La operación de secado se ha llevado a cabo como se detalla en el apartado 4.9 de “Materiales y métodos”. Para determinar el efecto de las variables de entrada, T y Q, sobre las de salida, Ts, R y IC_{50} , se ha empleado un diseño factorial 3^2 con 3 repeticiones del punto central. Los experimentos se han llevado a cabo de forma aleatoria. Los niveles de T (170, 200, $230\ ^\circ\text{C}$) han sido elegidos de acuerdo a las temperaturas recomendadas para el secado de leche (Bylund, 2003; Brenan, 2006). Los niveles de Q (4, 8, 12 mL/min) cubren un amplio rango permitiendo que el producto se transforme en polvo sin que haya problemas de condensación en la cámara de secado.

El análisis se ha llevado a cabo mediante superficies de respuesta (RSM), las variables de salida (Y) se relacionan con las de entrada mediante un polinomio de segundo orden:

$$Y = b_0 + b_1 \cdot T + b_2 \cdot Q + b_{11} \cdot T^2 + b_{12} \cdot T \cdot Q + b_{22} \cdot Q^2 \quad (11.1)$$

Mediante un análisis ANOVA se ha determinado la relevancia estadística de cada uno de los coeficientes, así como la del modelo. El modelo ajustado mediante RSM ha permitido la optimización de las variables de salida, mediante la determinación de las variables de entrada que maximizan las variables de salida.

11.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un único hidrolizado de 2L fue necesario para realizar el estudio del secado. La repetitividad de proceso de hidrólisis permitió obtener un hidrolizado con las mismas características que el obtenido en el capítulo “Caracterización e identificación de péptidos inhibidores ACE” (capítulo 10). El hidrolizado presentó un valor IC_{50} de 218.5 $\mu\text{g/mL}$ y su contenido en sólidos fue del 18.4 % (w/w).

En la Tabla 11.1 se muestran los 11 experimentos llevados a cabo para el estudio del proceso de estabilización, así como el valor experimental para las variables de salida obtenido para cada uno de ellos.

Tabla 11.1. Diseño experimental y valores medidos par a las variables de salida

Exp.	Var. Entrada		Var. Salida			
	T, °C	Q, mL/min	Ts, °C	R, %	H, %	IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$
1	230	4	152	5.9	5.7	270.46
2	170	4	110	42.5	7.2	264.21
3	200	8	108	30.6	5.7	242.36
4	200	12	95	26.1	6.8	260.08
5	170	12	86	20.1	9.1	234.09
6	230	8	136	11.1	4.3	280.90
7	170	8	93	32.3	4.6	298.13
8	200	8	114	29.4	5.0	252.89
9	230	12	121	11.1	5.5	304.39
10	200	8	116	27.0	6.5	286.02
11	200	4	133	16.6	4.8	299.01

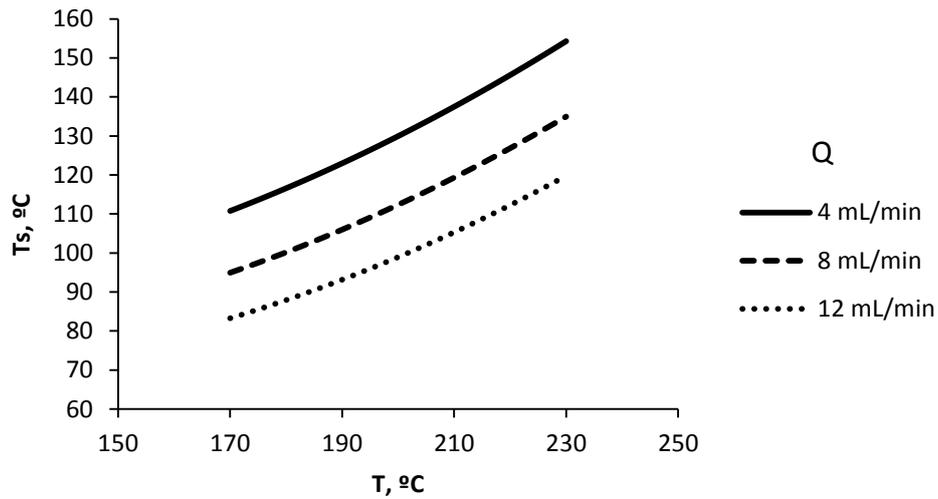
11.3.1. Temperatura de salida del aire

Una de las variables que no se pueden fijar, pero que pueden afectar directamente a la calidad final del producto es la temperatura del aire a la salida del secadero. Como se puede comprobar en la Tabla 11.1, los valores observados para T_s abarcaron un amplio rango, desde temperaturas bajas (86 °C) adecuadas para el secado de la leche (Brenan, 2006) a temperaturas mucho mayores (152 °C) que podrían generar degradaciones indeseadas. Por lo tanto, es deseable tener un modelo que permita predecir esta temperatura de salida del aire de acuerdo con las condiciones de trabajo con el fin de controlar T_s . Para ello, los datos experimentales obtenidos, se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$T_s = 109.6374 - 0.3629 \cdot T - 3.0373 \cdot Q + 0.0029 \cdot T^2 - 0.0146 \cdot T \cdot Q + 0.1299 \cdot Q^2 \quad (11.2)$$

El efecto de las variables de entrada se puede observar en la Figura 11.1. Como era de esperar, cuando el resto de variables permanecieron constantes, cuanto mayor fue la temperatura de entrada, más elevada fue la temperatura de salida. Obviamente, si se trabajara a caudal constante, un aumento de la temperatura de entrada provocaría un aumento de la temperatura de salida ya que la energía consumida para la evaporación no varía. Por el contrario, como se observa en la Figura 11.1b, T_s disminuyó al aumentar el caudal de alimentación. Es decir, para una misma temperatura de entrada, al aumentar el caudal se produjo un descenso en T_s . Esto se debió a que una mayor cantidad de energía fue necesaria para evaporar el incremento de agua originado al trabajar a un caudal mayor. Esta energía fue tomada de la corriente de aire y, por tanto, descendió su temperatura de salida.

a)



b)

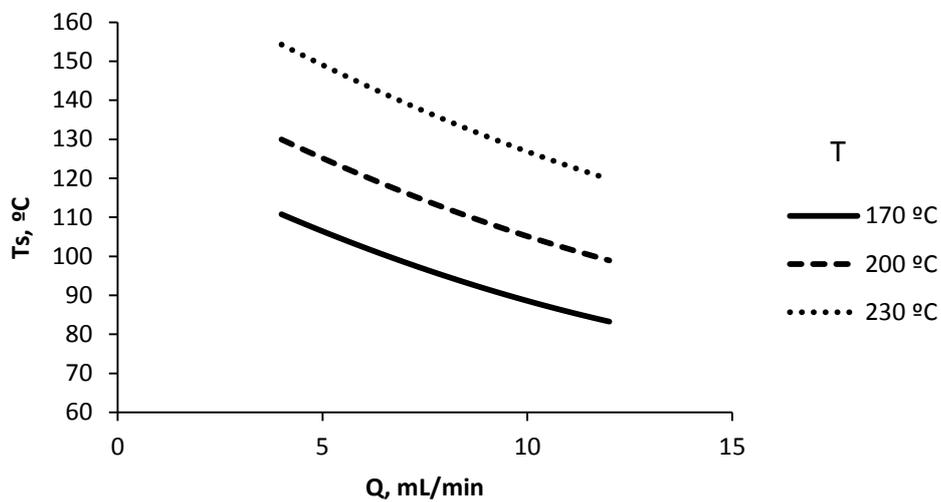


Figura 11.1. Efecto de la temperatura de entrada (a) y el caudal de alimentación (b) sobre la temperatura de salida.

Realizando un análisis de la varianza al modelo (Tabla 11.2) se pudo comprobar que T_s se vio afectada por los términos lineales de las dos variables de entrada, ya que sus p-valores fueron menores a 0.05. El modelo proporcionó una muy buena aproximación a los datos experimentales, atendiendo a su coeficiente de correlación ($R^2 = 0.98$) fue capaz de explicar el 98 % de la variación observada en T_s .

Tabla 11.2. Coeficientes de regresión y ANOVA para la temperatura de salida del aire.

	Coeficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	109.6374		
T	-0.3629	2400.000	<0.001
Q	-3.0373	1441.500	<0.001
T ²	0.0029	16.849	0.350
T·Q	-0.0146	12.250	0.420
Q ²	0.1299	10.949	0.444
Modelo		3881.548	<0.001
Residuos		79.434	
Total (Corr.)		3970.910	

R² = 0.980; Error estándar de estimación = 3.99; Media de error absoluto = 2.42

Representando los valores experimentales frente a los calculados (Figura 11.2) se puede comprobar la calidad del ajuste. Todos los puntos se encuentran prácticamente sobre la diagonal y ninguno sale fuera de las líneas discontinuas que marcan el 10 % de desviación respecto a la diagonal. El ajuste conseguido fue mucho mejor que otros descritos en bibliografía (Kurozawa et al., 2011)

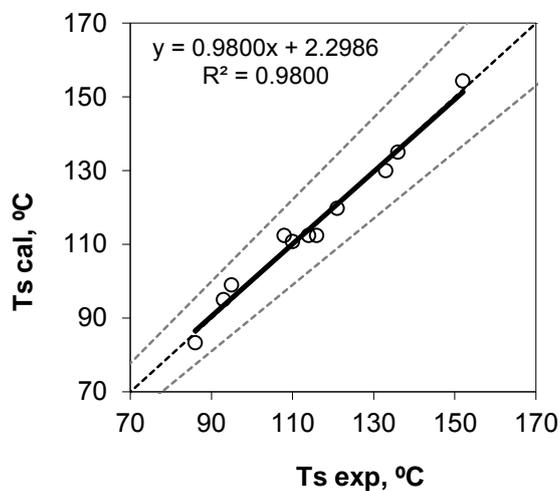


Figura 11.2. Valores calculados y experimentales de la temperatura de salida de aire.

La temperatura de salida no es una variable a optimizar, ya que normalmente supone una restricción en sí misma. Por ello es especialmente interesante el gráfico de contorno para Ts (Figura 11.3), donde se representa cada nivel de Ts en función de las variables que podemos controlar (T y Q). De esta forma cuando se establezca una limitación de temperatura de salida

concreta se puede ver claramente cuáles serían los límites de T y Q que no se pueden sobrepasar.

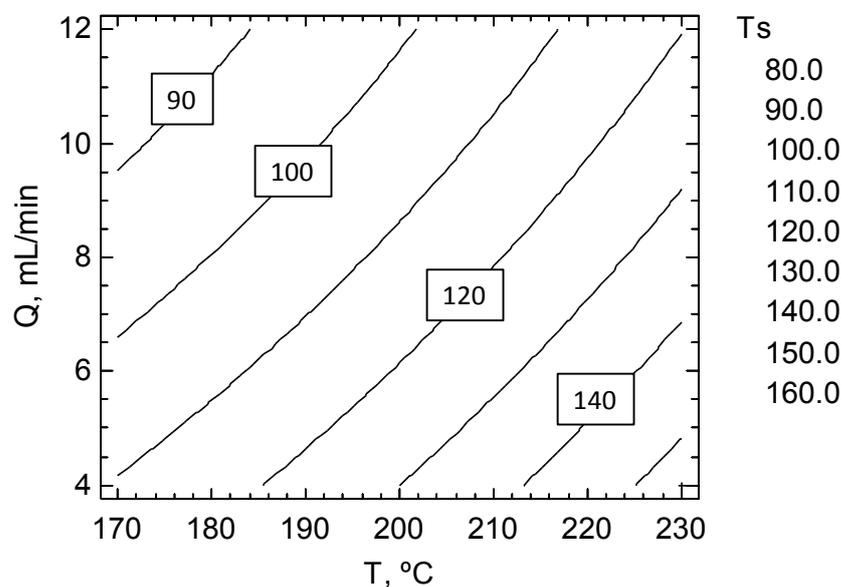


Figura 11.3. Gráfico de contornos para la temperatura de salida (°C) del aire en el secadero de atomización.

Por ejemplo, la mayoría de autores (Brenan, 2006) coinciden en que es recomendable evitar temperaturas de salida superiores a 100 °C para la producción de leche en polvo. Para conseguir esto, de acuerdo con la Figura 11.3, si se trabaja en las condiciones más suaves a la entrada ($T = 170$) el caudal de alimentación no debe ser inferior a 6.6 mL/min. Mientras que para que T_s no supere los 100 °C cuando se bombea el mayor caudal ensayado ($Q = 12$ mL/min), la temperatura del aire a la entrada debe ser inferior a 202 °C.

Aunque hasta el momento no se han establecido valores de temperaturas máximas tolerables para los péptidos inhibidores de ACE, temperaturas elevadas podrían ocasionar pérdida de poder inhibidor. Posteriormente, punto 11.3.4, se discutirá el efecto de estas temperaturas sobre la actividad inhibidora.

11.3.2. Rendimiento

Durante el proceso de secado parte del producto seco se pierde, es decir el producto queda retenido en el sistema imposibilitando su recuperación. El hidrolizado seco puede quedar adherido en la parte superior del secadero y en las paredes de la cámara de secado. El rendimiento del proceso de secado se define como el la proporción de los sólidos recuperados.

$$R = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad (11.3)$$

donde m_s es la masa de sólidos secos obtenidos tras el proceso de secado y m_i es la masa de sólidos secos que han sido introducidos en el secadero en forma de disolución. Los valores de rendimiento obtenidos experimentalmente (Tabla 11.1) oscilaron entre 5.9 y 42.5 %, lo que indica la fuerte variabilidad que tiene dependiendo de las condiciones de operación. Por tanto, desde un punto de vista económico, es fundamental establecer la relación entre las variables de entrada (T y Q) y el rendimiento para poder optimizar el proceso. Los datos experimentales se ajustaron a la siguiente ecuación polinómica de segundo orden:

$$R = -12.2146 + 1.0842 \cdot T - 7.6107 \cdot Q - 0.0048 \cdot T^2 + 0.0599 \cdot T \cdot Q - 0.2956 \cdot Q^2 \quad (11.4)$$

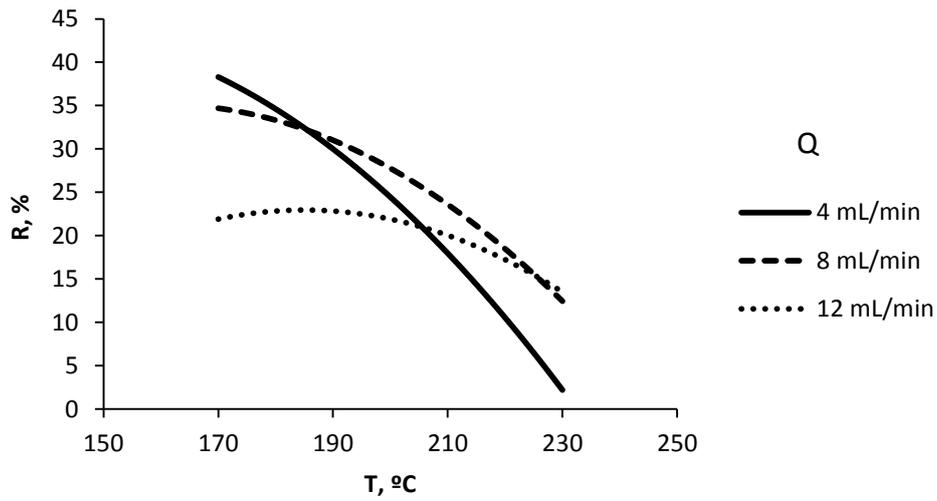
En la Figura 11.4 se representa cómo varió el rendimiento al modificar cada una de las variables de entrada. El aumento en la temperatura de entrada del aire fue perjudicial para el rendimiento. Este comportamiento fue igualmente observado en otros estudios (Kurozawa et al., 2011). Para alimentos con alto contenido en azúcares, el aumento de la temperatura del aire a la entrada debe ser controlado, ya que puede dar lugar a partículas con gran poder de adherencia que se quedarían pegadas a las paredes del secadero reduciendo el rendimiento. Para un contenido en humedad dado, una partícula pasa a ser pegajosa por un aumento de temperatura, la temperatura a la que ocurre esta transición se conoce como temperatura de pegajosidad o temperatura de punto pegajoso. En alimentos con azúcares, esta temperatura se suele relacionar con el punto de transición vítrea. La temperatura de transición vítrea (T_g) se define como la temperatura a la que polímeros amorfos o parcialmente cristalizados pasan de un estado pseudo-fluido o gomoso a un estado pseudo-sólido o vítreo y viceversa. Aunque ambas temperaturas no coinciden, sí existe una diferencia constante entre ambos valores (Hennigs et al., 2001). Así, para que un producto comience a comportarse de forma pegajosa se debe superar su T_g en un valor determinado.

La temperatura de pegajosidad es un parámetro más práctico para la determinación de los depósitos generados en las paredes de los secaderos por atomización. Hennigs et al. (2001) establecieron las temperaturas de pegajosidad para leche desnatada en función de la humedad residual. Con esos datos y teniendo en cuenta que la humedad media de los hidrolizados secos fue de 5.7 %, podríamos concluir que la temperatura de pegajosidad para nuestro producto sería aproximadamente de 50 °C. Por otra parte, Hogan et al. (2010),

establecen que para una leche desnatada con una humedad cercana al 6 %, la T_g se alcanzaría un valor de 40 °C. Además, en este estudio se comprobó cómo la temperatura a la que comenzaría a producirse la transición al estado pegajoso está influenciada por la concentración de proteína. Esto se debe a que la presencia de compuestos de elevado peso molecular aumentaría la temperatura a la que el producto comienza a comportarse de forma gomosa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Hogan et al. (2010), se puede estimar que para una leche en polvo con una concentración de proteína similar a la de nuestros hidrolizados (33 %), el incremento de temperatura sobre T_g necesario para pasar a estado gomoso sería de 25 °C. Por tanto, comenzaríamos a tener problemas con el producto a partir de 65 °C. De acuerdo con estos estudios, mientras mayor sea la diferencia entre la temperatura de salida del aire y los 65 °C, mayor será el grado de pegajosidad y, por tanto, menor el rendimiento obtenido en el proceso.

En general, caudales bajos mejoraron el rendimiento del proceso. Este comportamiento se debió a que las gotas atomizadas a caudales bajos fueron de menor tamaño y su superficie específica fue mayor, lo que mejoró la eficiencia de la transferencia de materia y energía entre el fluido atomizado y el aire de secado. Al producirse un secado rápido del agua se forma una capa sólida en la superficie, la formación de esta superficie sólida dificulta la adhesión de las partículas en las paredes del secadero. Además, cuando se emplean caudales de alimentación altos se podría generar condensación en la cámara de secado debido a que no es posible evaporar toda el agua que contiene la alimentación, por lo que el rendimiento final se vería reducido. Este comportamiento ha sido descrito por diversos autores (Tonon et al., 2008; Cai y Corke, 2000). Sin embargo, como se observa en la Figura 11.4a, a altas temperaturas el rendimiento aumentó con el caudal de alimentación. Esto pudo ser debido a que a altas temperaturas el secado es relativamente bueno, incluso trabajando a altos caudales. De acuerdo con lo visto anteriormente, T_s disminuyó al aumentar el caudal, reduciéndose así la diferencia con T_g y, por tanto, disminuyendo igualmente la capacidad de adhesión de las partículas (Kurozawa et al., 2011).

a)



b)

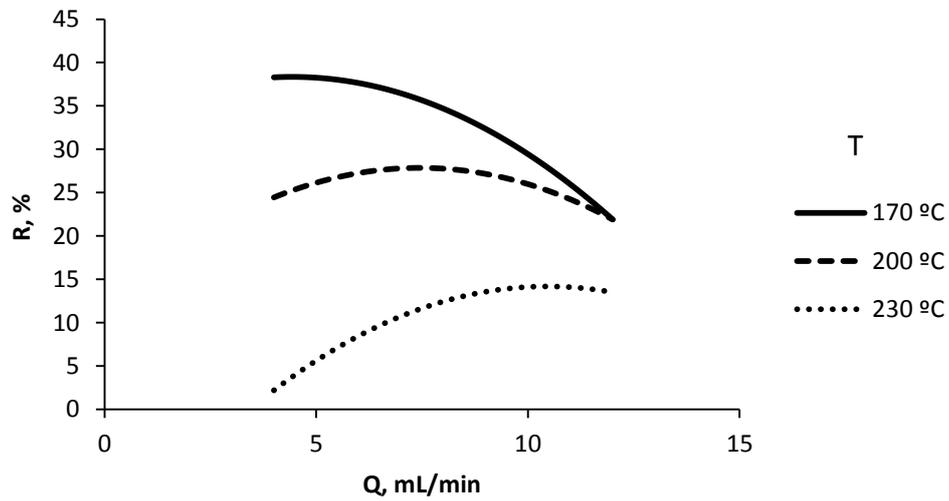


Figura 11.4. Efecto de la temperatura de entrada (a) y el caudal de alimentación (b) sobre el rendimiento.

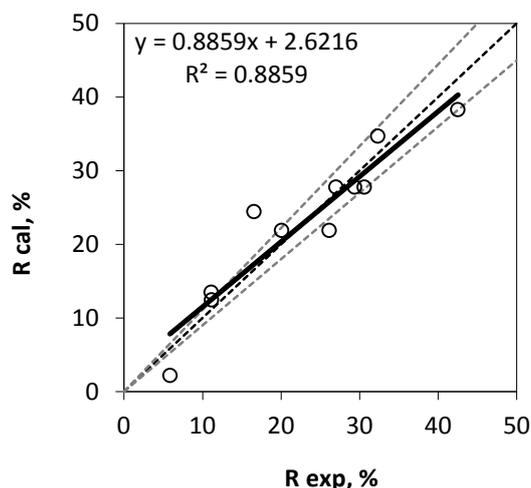
De acuerdo con el análisis ANOVA realizado al modelo (Tabla 11.3), los efectos significativamente relevantes fueron el lineal de temperatura y el de interacción.

Tabla 11.3. Coeficientes de regresión y ANOVA para rendimiento.

	Coeficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	-8.2527		
T	1.0344	742.578	0.004
Q	-7.2669	9.688	0.580
T ²	-0.0047	44.696	0.260
T·Q	0.0577	191.764	0.047
Q ²	-0.2869	53.388	0.224
Modelo		1042.115	0.023
Residuos		138.833	
Total (Corr.)		1216.500	

$R^2 = 0.886$; Error estándar de estimación = 5.27; Media de error absoluto = 3.00

La relevancia del modelo ($p = 0.023$) indica que la variabilidad observada en el rendimiento no es fruto del azar, es decir, las variables independientes son las que determinan el valor de la variable de salida. El modelo ajustó los datos adecuadamente, siendo capaz de explicar el 88.6 % de la variabilidad observada. Como en estudios anteriores, al representar los valores calculados frente a los experimentales (Figura 11.5) se puede observar como los puntos se sitúan en la zona cercana de la diagonal. Sólo algunos puntos se sitúan fuera de las líneas discontinuas que marcan el 10 % de desviación frente a la diagonal.

**Figura 11.5. Valores calculados y experimentales para el rendimiento.**

En el gráfico de contorno (Figura 11.6) se puede comprobar cómo aumentaría el rendimiento al disminuir T y Q, hasta alcanzar un óptimo a 170 °C y 4.35 mL/min. Como se observa, el máximo se encontraría a la mínima temperatura ensayada mientras que, para el caudal, el

óptimo se encontraría algo por encima del menor valor ensayado. El valor del rendimiento para este óptimo sería del 38.4 %.

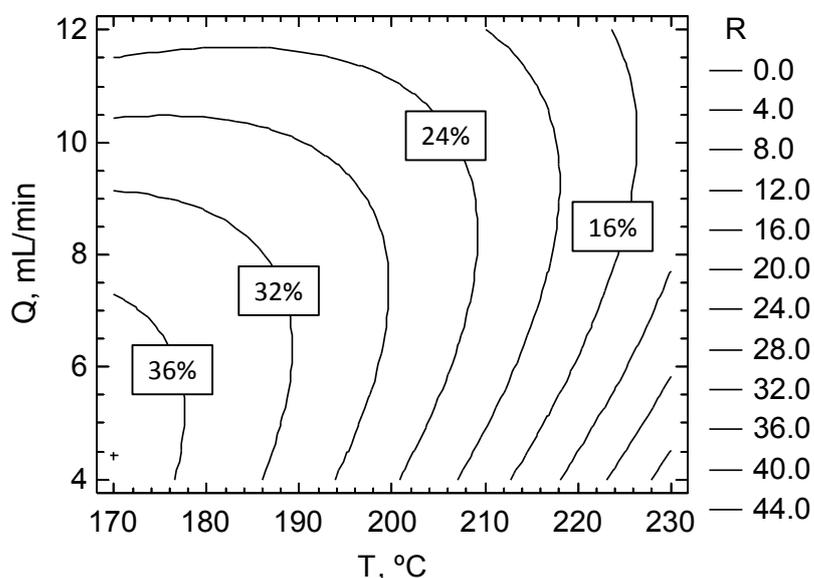


Figura 11.6. Gráfico de contornos del rendimiento (%) del secado por atomización.

Dependiendo del producto a secar el rendimiento del proceso puede variar de forma considerable. Por ejemplo, Telang y Thorat (2010) obtuvieron rendimientos muy altos, entre 48.89 y 80.24 % para fermentados de leche de soja. Valores menores, 60 %, fueron registrados por Fernández-Pérez et al. (2004) en el secado de un preparado de sopa. En cuanto a los resultados obtenidos para productos hidrolizados, el rendimiento de los hidrolizados de pescado suele estar comprendido entre el 10-15 % (Abdul-Hamid, 2002). Kurozawa et al., (2011) obtuvieron rendimientos de hasta el 74 % para hidrolizados de carne.

No se han podido encontrar referencias que indiquen el rendimiento de procesos de secado de hidrolizados de leche. El rendimiento obtenido en este trabajo fue menor que el obtenido para hidrolizados de carne pero fue muy superior al obtenido en hidrolizados de pescado.

Una posible forma de aumentar el rendimiento del proceso sería efectuar una concentración previa mediante evaporadores (de vacío, multiefecto, película descendente, etc.). Si la concentración en sólidos fuera mayor, el agua a evaporar para un caudal dado sería menor y, por tanto, se podría trabajar a menores temperaturas. Lo que favorecería por una parte el ahorro energético y por otra mejoraría el rendimiento debido a que el producto sería menos pegajoso, ya que la diferencia entre temperatura del producto y la temperatura de transición vítrea sería menor. Sin embargo, sería necesario considerar si el potencial aumento en el rendimiento y el ahorro energético originado al trabajar a menores temperaturas es suficiente

como para compensar el gasto que supone una etapa de evaporación previa al secado por atomización.

11.3.3. Humedad del hidrolizado seco

La humedad final del producto es una característica importante desde el punto de vista de la estabilidad, ya que evita la proliferación de microorganismos. Los datos obtenidos en el estudio (Tabla 11.1) estuvieron comprendidos entre 4.3 y 9.1 %. Estos valores fueron algo superiores a los obtenidos por Birchal et al. (2005) para leche en polvo que obtuvieron valores comprendidos entre 5.3 y 6.4 %. Humedades aún más bajas (1.22 – 4.5 %) fueron obtenidas en el secado de leche de soja (Telang y Thorat, 2010). Mientras que para hidrolizados de concentrado de lactosuero se obtuvieron humedades cercanas al 5 % (Yoo et al., 2009).

De forma general, se considera que una humedad inferior al 10 % inactiva microorganismos y enzimas, aunque humedades inferiores al 5 % son recomendables para conservar las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos.

Los datos observados para las humedades se ajustaron a la siguiente ecuación cuadrática:

$$H = 6.3637 + 0.0237 \cdot T - 0.2787 \cdot Q - 0.00005 \cdot T^2 - 0.0044 \cdot T \cdot Q + 0.0817 \cdot Q^2 \quad (11.5)$$

De acuerdo con esta ecuación, los efectos de las variables de entrada sobre la humedad pueden observarse en la Figura 11.7. Al aumentar la temperatura de entrada del aire se produjo un descenso en el valor de la humedad final. Resultados similares han sido descritos por diversos autores (Telang y Thorat, 2010; Yoo et al., 2009). El aumento de T provoca un incremento en la diferencia entre la temperatura del aire y de la alimentación, lo que genera una mayor fuerza impulsora para la eliminación de humedad. Además a mayor temperatura, mayor capacidad de absorber agua tiene el aire (menor humedad relativa). Todo ello provoca que se generen productos con menor humedad residual.

En la Figura 11.7b se puede observar cómo caudales elevados generaron productos con alta humedad. Habitualmente, las menores humedades son obtenidas a los caudales más bajos (Telang y Thorat, 2010) debido a que a caudales altos las gotas atomizadas son de mayor tamaño (Filková et al., 2006) lo que prolonga el tiempo de secado y como resultado la humedad final del producto seco es mayor. Contrariamente, con el modelo obtenido parece haber un valor de Q que minimiza la humedad y que no se corresponde con el menor valor de Q ensayado.

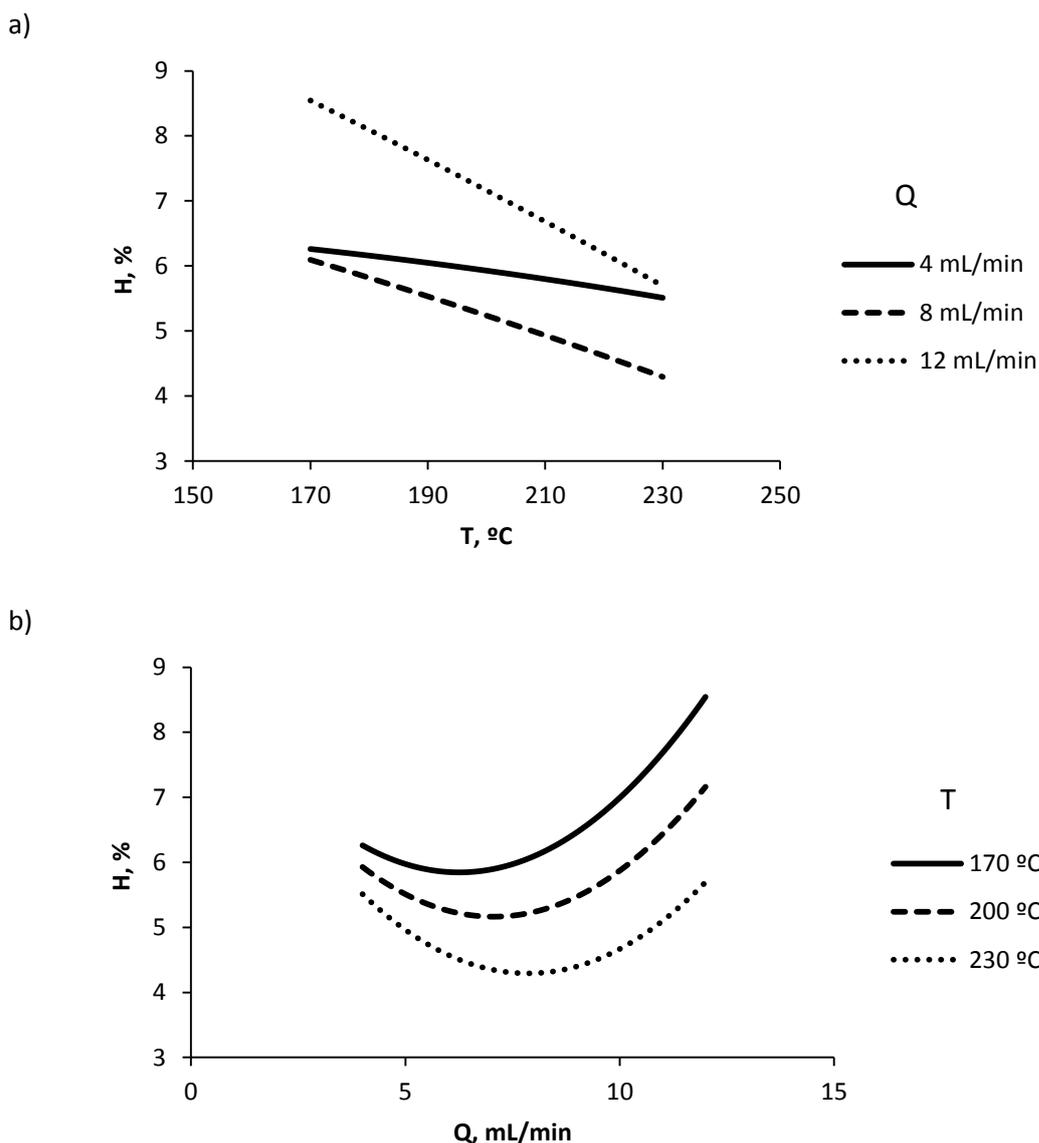


Figura 11.7. Efecto de la temperatura de entrada (a) y el caudal de alimentación (b) sobre la humedad.

Mediante un análisis ANOVA (Tabla 11.4) se comprobó que ninguno de los coeficientes determinados para el modelo era significativo. Además, el p-valor del modelo fue mayor de 0.05, lo que indicaría que no se puede rechazar la hipótesis de que las variaciones observadas se deban a otros factores y o al azar. Resultados similares fueron descritos por Birchall et al. (2005) en el secado por atomización de leche. Los autores emplearon un amplio rango de niveles para la temperatura de entrada y de caudal de alimentación, sin embargo, no encontraron variaciones significativas en la humedad de los distintos hidrolizados secos obtenidos.

Tabla 11.4. Coeficientes de regresión y ANOVA para humedad.

	Coeficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	6.3637		
T	0.0237	4.860	0.117
Q	-0.2787	2.282	0.251
T ²	0.00005	0.004	0.956
T·Q	-0.0044	1.103	0.408
Q ²	0.0817	4.333	0.134
Modelo		12.582	0.256
Residuos		6.768	
Total (Corr.)		19.602	

$R^2 = 0.655$; Error estándar de estimación = 1.16; Media de error absoluto = 0.62

A pesar de la falta de relevancia del modelo, éste conseguiría explicar el 65.5 % de los datos experimentales. Como se observa en la Figura 11.8, donde se comparan valores experimentales y calculados, la línea de ajuste se desvía de la diagonal aunque la mayoría de los puntos se encuentran dentro de las líneas que marcan el 10 % de desviación respecto a la diagonal.

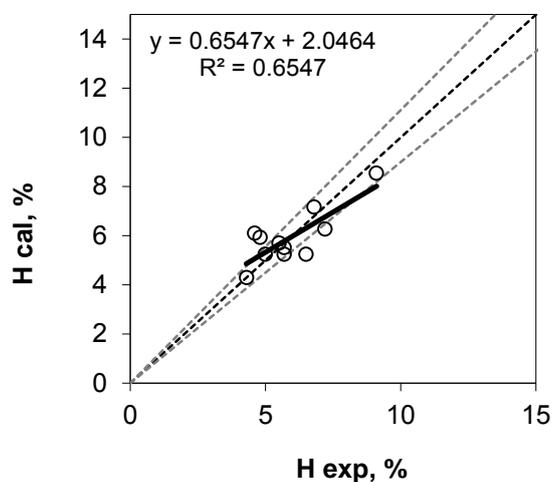


Figura 11.8. Valores calculados y experimentales para la humedad.

La ecuación polinómica no resultó adecuada para modelar el comportamiento de la humedad del producto seco.

11.3.4. Actividad inhibidora

Las altas temperaturas alcanzadas en el secado podrían alterar los péptidos que componen el hidrolizado provocando una pérdida de la actividad inhibidora. Para determinar cómo afectan las variables de operación sobre la actividad inhibidora, a cada muestra secada se le determinó su IC_{50} (Tabla 11.1). El mejor valor IC_{50} obtenido fue 234.09 $\mu\text{g/mL}$ mientras que el más desfavorable fue 304.39 $\mu\text{g/mL}$.

Para poder conocer la influencia de las variables de proceso (T y Q) sobre la actividad inhibidora del producto final se ajustaron los datos experimentales a un modelo cuadrático:

$$IC_{50} = 817.6616 - 4.8430 \cdot T - 21.7981 \cdot Q + 0.0106 \cdot T^2 + 0.1064 \cdot T \cdot Q - 0.0257 \cdot Q^2 \quad (11.6)$$

En la Figura 11.9 se representa el efecto que las variables de entrada tienen sobre la capacidad inhibidora de los productos secos. Los valores altos de temperatura empeoraron la actividad inhibidora, sin embargo, a caudales bajos no hubo tantas diferencias entre temperaturas. Del mismo modo, caudales altos generaron hidrolizados con menor poder inhibidor, aunque a temperaturas elevadas el comportamiento se invertía.

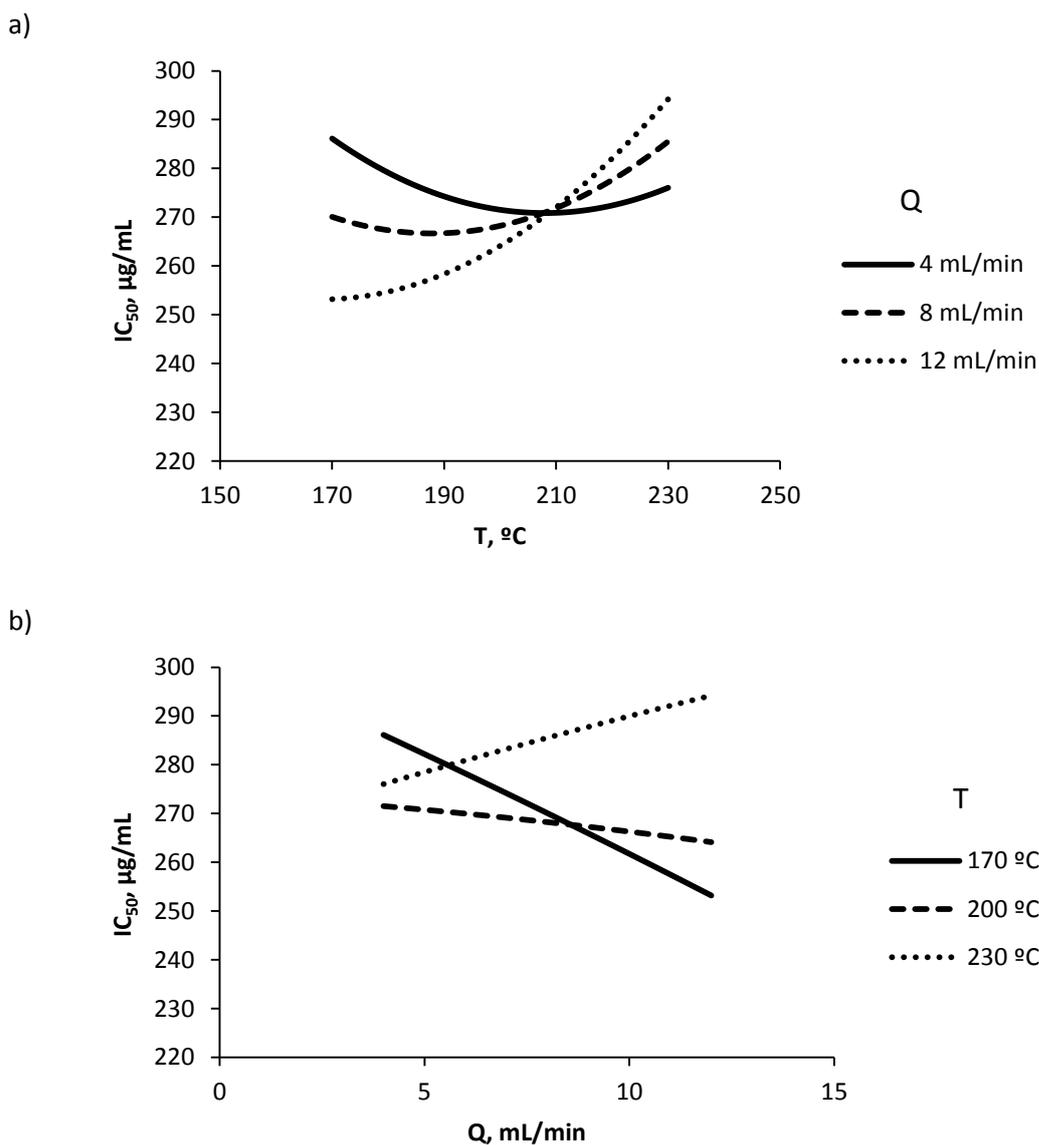


Figura 11.9. Efecto de la temperatura de entrada (a) y el caudal de alimentación (b) sobre la actividad inhibitoria (IC_{50}) de los hidrolizados secos.

El resultado del análisis ANOVA realizado para el modelo se resume en la Tabla 11.5. Como en el caso anterior, ninguno de los coeficientes presentó un p-valor inferior a 0.05. Del mismo modo, el modelo resultó no significativo ($p > 0.05$), lo que indicaría que no se puede rechazar la hipótesis nula de que la variable de salida no está influenciada por las variables independientes. Es decir, no se puede descartar que las variaciones observadas se deban al azar.

Tabla 11.5. Coeficientes de regresión y ANOVA para la actividad inhibidora.

	Coeficiente	Suma de cuadrados	p-valor
Indep.	817.6616		
T	-4.8430	358.226	0.504
Q	-21.7981	81.8677	0.745
T ²	0.0106	231.561	0.588
T·Q	0.1064	652.475	0.376
Q ²	-0.0257	0.429	0.981
Modelo		1324.558	0.842
Residuos		3456.075	
Total (Corr.)		4792.660	

R² = 0.279; Error estándar de estimación = 26.29; Medía de error absoluto = 15.19

El coeficiente de correlación obtenido fue muy bajo, el modelo tan sólo fue capaz de explicar el 27.9 % de los datos experimentales. En la Figura 11.10 se puede ver la dispersión de los datos calculados frente a los experimentales, el ajuste de los mismos se desvía considerablemente del ideal, que se correspondería con la diagonal.

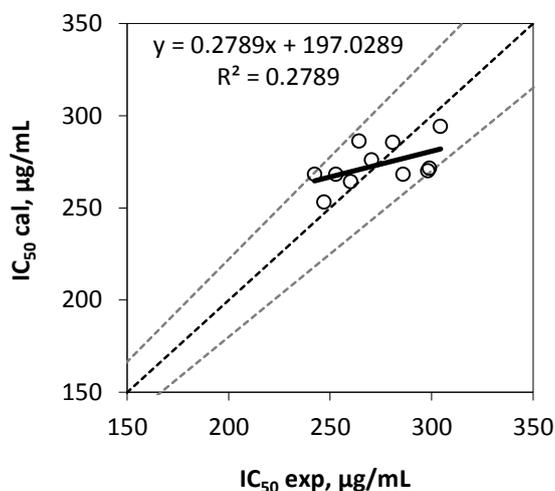


Figura 11.10. Valores calculados y experimentales para la humedad.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la actividad inhibidora no depende de las variables estudiadas. Una de las variables que podrían provocar una alteración de la actividad inhibidora es la temperatura de aire de salida. Los valores de Ts obtenidos experimentalmente (Tabla 11.1) estuvieron comprendidos entre 86 y 152 °C. Brenan (2006) establece que los valores de temperatura a la salida en el secado de la leche deben estar entre 80-100, otros autores son más restrictivos y limitan esta temperatura a 70-90 (Bylund, 2003). Los valores

inferiores de T_s obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos para evitar la pérdida de propiedades en el secado de la leche, mientras que los valores más altos obtenidos están considerablemente por encima de estos límites. El amplio rango de temperaturas finales obtenidas posibilitaría el estudio del efecto de la temperatura de salida sobre la estabilidad de la actividad inhibidora. Aunque esta variable está controlada por la temperatura de entrada y el caudal de alimentación, en la Figura 11.11 se representa el valor IC_{50} para los hidrolizados secados en función de la temperatura de salida obtenida. Se puede comprobar cómo tampoco se observa ninguna relación entre ambos.

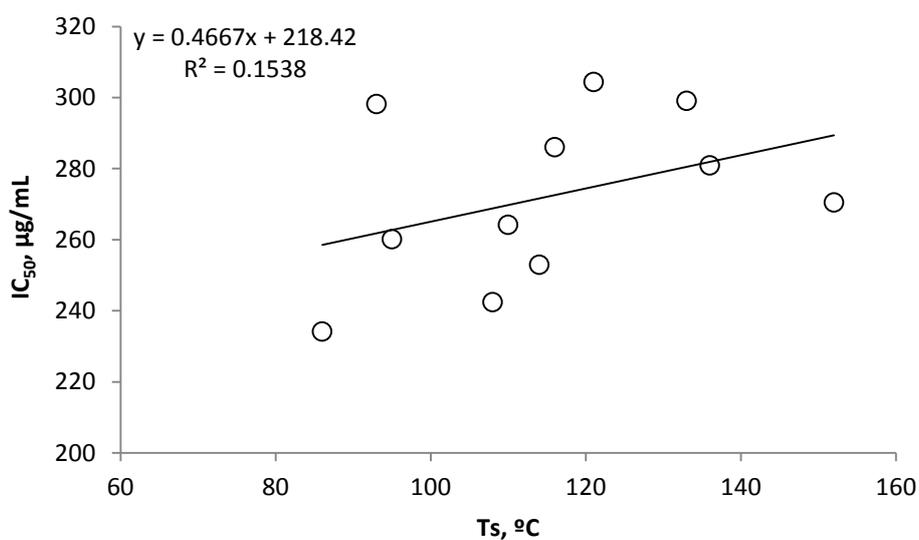


Figura 11.11. Relación entre la temperatura de salida del aire (T_s) y la actividad inhibidora (IC_{50}) del hidrolizado seco.

Mediante un análisis de la varianza simple se compararon conjuntamente los valores de IC_{50} obtenidos para cada uno de los experimentos de secado realizados. Como requisito previo se comprobó la homogeneidad de los datos mediante la prueba de Hartley (máxima razón-F). Para este caso, el estadístico calculado (F_{\max} calculada = 111.6) tuvo un valor muy inferior al tabulado para 2 grados de libertad y 11 condiciones o grupos ($F_{\max} = 626$), por tanto, se cumpliría el requisito de homogeneidad. El resultado del análisis ANOVA se presenta en la Tabla 11.6.

Tabla 11.6. Análisis simple de la varianza para los 11 hidrolizados secados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad	Promedio cuadrados	F calculada	p-valor	F tabulada
Intragrupos	14377.96	7	1437.80	2.183	0.061	2.296
Intergrupos	14492.89	22	658.77			
Total	28870.85	29				

El valor del estadístico F calculado fue menor que el tabulado, por lo que no existe diferencia significativa entre los valores de actividad inhibidora obtenidos en los diferentes experimentos. Teniendo en cuenta lo anterior, la actividad inhibidora de los hidrolizados obtenidos mediante secado por atomización se podría estimar como el valor medio de todas las determinaciones, lo que supone un IC_{50} de 273.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Teniendo en cuenta que el IC_{50} del hidrolizado previo al proceso de deshidratación fue de 218.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la operación de secado por atomización provocó una pérdida de actividad en los hidrolizados del 25 %.

Un análisis ANOVA similar al anterior pero incluyendo el la muestra inicial (Tabla 11.7), permitió determinar que la diferencia observada entre el valor de inhibición del hidrolizado original y el de los hidrolizados secados por atomización era estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Lo que confirmó que el secado redujo un cuarto la actividad inhibidora del hidrolizado original. Sin embargo, la capacidad inhibidora del hidrolizado seco ($IC_{50} = 273.23 \mu\text{g}/\text{mL}$) sigue siendo lo suficientemente alta para utilizarse como ingrediente en fórmulas alimentarias destinadas al control de la hipertensión.

Tabla 11.7. Análisis simple de la varianza para el hidrolizado inicial y los 11 hidrolizados secados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad	Promedio cuadrados	F calculada	p-valor	F tabulada
Intragrupos	22614.76	11	2055.89	3.38	0.006	2.216
Intergrupos	14586.28	24	607.76			
Total	37201.04	35				

Existen pocos trabajos que estudien el efecto del secado por atomización de los hidrolizados de proteína. En uno de ellos, He et al. (2008) comprobaron cómo aunque el perfil peptídico de los hidrolizados cambiaba ligeramente tras el secado por atomización, la actividad inhibidora no variaba, por lo que los péptidos inhibidores de ACE presentes en sus hidrolizados eran

termoestables. En este estudio se obtuvieron unos valores de IC_{50} de 970 $\mu\text{g/mL}$ para el hidrolizado de *Acetes chinensis*.

Del mismo modo en otro estudio, esta vez con hidrolizado de proteínas lácteas (Contreras et al., 2011), se determinó que el hidrolizado de caseínas con pepsina no reducía su capacidad inhibidora después de un secado por atomización usando temperaturas de entrada de 140 °C. Los valores de IC_{50} obtenidos para sus hidrolizados fueron de 27.38 $\mu\text{g proteína/mL}$ (39.47 $\mu\text{g producto seco/mL}$). Valores considerablemente inferiores a los obtenidos en este estudio, sin embargo hay que tener en cuenta que el hidrolizado de partida fue sometido a un proceso de ultrafiltración tangencial para clarificar el producto. En el estudio no se detalla las condiciones de esta filtración, pero es muy probable que el filtrado obtenido contuviera una mayor proporción de péptidos activos (de menor tamaño) y, por tanto, su correspondiente secado generaría un producto seco con una actividad inhibidora mayor. Además, las diferencias en el método de análisis empleado y en la concentración de enzima (ACE) empleada hacen que la comparación entre valores de inhibición de ACE sea complicada.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta ahora, podríamos concluir que las condiciones óptimas para el secado serían las que maximizaron el rendimiento: 170 °C y 4.35 mL/min. Estas condiciones generarían una $T_s = 109$ °C. Al no existir diferencias significativas entre los valores de humedad y actividad inhibidora de los hidrolizados producidos, se estima que el hidrolizado seco tendría un valor intermedio de 5.7 % de humedad y $IC_{50} = 273.23$ $\mu\text{g/mL}$.

Seleccionando temperaturas relativamente bajas de operación se reducen costes de operación y se evitan posibles alteraciones en propiedades importantes. Por ejemplo, al trabajar a altas temperaturas, porcentajes elevados de aminoácidos esenciales podrían desaparecer, reduciendo la calidad nutricional del producto (Abdul-Hami, 2002).

Como se ha demostrado los hidrolizados de caseínas con capacidad inhibidora de ACE producidos en este trabajo presenta una buena capacidad inhibidora que se mantiene en un valor aceptable tras el secado por atomización.

Por otra parte, estos resultados justificarían el empleo del secado por atomización para reducir el posible amargor de los hidrolizados. De acuerdo con Favaro-Trindade et al. (2010) un proceso de secado por atomización empleando gelatina y soja conjuntamente con el hidrolizado es capaz de reducir significativamente el amargor del producto.

11.4. CONCLUSIONES

En el proceso de estabilización por secado por atomización se han correlacionado las variables de salida (temperatura de salida del aire de secado y el rendimiento del proceso) con las variables de entrada (temperatura de entrada de aire y caudal de alimentación de hidrolizado). El rendimiento del proceso presenta un óptimo a 170 °C y 4.35 mL/min. La humedad y actividad inhibidora de los hidrolizados secos son independientes de las variables de entrada estudiadas. El proceso de secado conduce a pérdidas de la actividad inhibidora de los hidrolizados de caseínas generados en la hidrólisis con la mezcla de subtilisina y tripsina del 25%. A pesar de la pérdida de actividad, se obtiene un producto seco con un IC₅₀ de 273.23 µg/mL y una humedad de 5.7 %, características adecuadas para su inclusión en fórmulas de alimentos funcionales.

12. Conclusiones

La investigación realizada ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. El grado de hidrólisis (DH) y el porcentaje de inhibición de ACE (ACEI) de los hidrolizados de leche de cabra producidos con subtilisina y tripsina han sido optimizados mediante la técnica de superficies de respuesta. Para DH los valores máximos se obtienen para las siguientes condiciones de operación: enzima subtilisina DH=0.218, T=60.5 °C y ES=5 % - enzima tripsina DH=0.159, T=55 °C y ES=5 %. Para ACEI los valores máximos se obtienen para las siguientes condiciones de operación: enzima subtilisina ACEI=0.320, T=52.7 °C y ES=5 % - enzima tripsina ACEI=0.399, T=30 °C y ES=1 %. La optimización conjunta de DH y ACEI genera un Pareto de soluciones de compromiso en función del valor de α , que pondera la priorización de DH frente ACEI. Para subtilisina si α aumenta de 0 a 1, la temperatura se incrementa de 52.7 a 60.5 °C, mientras que ES permanece constante al 5%. En el caso de tripsina, para $\alpha < 0.70$, el óptimo se encuentra a 30 °C y 1 %, mientras que para $\alpha > 0.70$, el óptimo está a 55 °C y 5 %.
2. El proceso de ultrafiltración por membranas cerámicas de 0.14 μm , con $v = 3.3 \text{ m/s}$, $T=50^\circ\text{C}$ y $\Delta P=1\text{bar}$, permite la separación de las fracciones proteicas, caseínas y proteínas séricas, de la leche de cabra. El descenso de flujo observado durante el proceso se ajusta al mecanismo de bloqueo completo de poro. La etapa de limpieza alcalina propuesta (20 g/L de NaOH y 2g/L de SDS, $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$, $v=3.3 \text{ m/s}$, $\Delta P =1 \text{ bar}$ y 30 min) recupera las características filtrantes de la membrana al 99%, lo que permite su reutilización.
3. Los hidrolizados obtenidos con mezclas de enzimas de origen animal y bacteriano, tripsina y subtilisina, presentan los mejores valores para DH y ACEI. Sin embargo, no se encontró relación entre grado de hidrólisis y actividad inhibidora de ACE. La actividad inhibidora de ACE permanece prácticamente constante una vez transcurrida la primera hora de reacción. No obstante en los hidrolizados con tripsina se observa un leve descenso de la actividad inhibidora con el tiempo, especialmente apreciable en la hidrólisis de caseínas.
4. Los hidrolizados de caseínas de leche de cabra con tripsina y subtilisina presentan la mayor actividad inhibidora de ACE en las fracciones de tamaño molecular inferiores a 2.3 kDa con valores de IC_{50} comprendidos entre 5 y 57 $\mu\text{g/mL}$, lo que supone una actividad inhibidora cercana a la de algunos de los mejores inhibidores de ACE descritos en bibliografía. Algunos de los péptidos identificados en las fracciones activas, como TGPIP, LHLPLPL, HLPLPL y EMPFPK, coinciden con inhibidores de ACE

identificados previamente por otros autores. El péptido WY es el único componente de una de las fracciones con mayor potencial inhibidor de ACE, que se identifica por primera vez en hidrolizados de caseínas.

5. La digestión gastrointestinal completa simulada no provoca pérdidas significativas de la actividad inhibidora del hidrolizado de la fracción proteica de caseínas de leche de cabra cuando la enzima utilizada es subtilisina o la mezcla subtilisina y tripsina. Sin embargo se han detectado pérdidas superiores al 50% en dicha actividad cuando la enzima utilizada es tripsina.
6. La filtración tangencial con membranas cerámicas de 50 kDa de la fracción proteica de caseínas de leche de cabra hidrolizada con una mezcla de subtilisina y tripsina, responde al modelo de colmatación de bloqueo completo de poro. Esta filtración es un método adecuado para la purificación de péptidos inhibidores de ACE, ya que logra obtener mejoras en la capacidad inhibidora (IC_{50}) del 30 % para factores de concentración de 3. Sin embargo, una segunda etapa de filtración mediante membranas de 3 kDa no mejora los resultados obtenidos. Las características filtrantes de las membranas utilizadas se recuperan al 97% mediante limpieza alcalina en condiciones standard.
7. En el proceso de estabilización por secado por atomización se han correlacionado las variables de salida (temperatura de salida del aire de secado y el rendimiento del proceso) con las variables de entrada (temperatura de entrada de aire y caudal de alimentación de hidrolizado). El rendimiento del proceso presenta un óptimo a 170 °C y 4.35 mL/min. La humedad y actividad inhibidora de los hidrolizados secos son independientes de las variables de entrada estudiadas. El proceso de secado conduce a pérdidas de la actividad inhibidora de los hidrolizados de caseínas generados en la hidrólisis con la mezcla de subtilisina y tripsina del 25%. A pesar de la pérdida de actividad, se obtiene un producto seco con un IC_{50} de 273.23 $\mu\text{g/mL}$ y una humedad de 5.7 %, características adecuadas para su inclusión en fórmulas de alimentos funcionales.

13. Bibliografía

- Abert, T. and Kneifel, W. (1992). Physicochemical and functional properties of protein hydrolyzates as obtained by treatment with different enzymes, In Protein and Fat Globule Modification by Heat Treatment, Homogenization and Other Technological Means for High Quality Dairy Products. International Dairy Federation. Special Issue No. 9303. Int. Dairy Federation, Brussels.
- Abdul-Hamid A., Bakar, J. and Bee, G.H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry* 78, 69–74.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T. (1998). Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides Derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion. *Journal of Dairy Science* 81, 3131–3138.
- Adam, A., Cugno, M., Molinaro, G., Perez, M., Lepage, Y. and Agostoni, A. (2002). Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-edema on ACE inhibitors. *Lancet* 359, 2088–2089.
- Adler-Nissen, J. and Olsen, H.S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymically modified soy protein. *ACS Symposium Series* 92, 125-46.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R. and Nakamura, Y. (2005). Effect of Powdered Fermented Milk with *Lactobacillus helveticus* on Subjects with High-Normal Blood Pressure or Mild Hypertension. *Journal of American College of Nutrition* 24, 257–265.
- Aluko, R.E. (2007). Technology for the production and utilization of food protein-derived anti-hypertensive peptides: a review. *Recent Patents on Biotechnology* 1, 260–267.
- Appel, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Winghauser, M.M, Lin, P.H. and Karanja, N. (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *New England Journal of Medicine* 336, 1117–1124.
- Bartlett, M., Bird, M.R. and Howell, J.A. (1995). An experimental study for the development of a qualitative membrane cleaning model. *Journal of membrane science* 105, 147-157.
- Bernacka, H. (2011). Health-promoting properties of goat milk. *Medycyna Weterynaryjna* 67, 507–511.

Bindom, S.M. and Lazartigues, E. (2009). The sweeter side of ACE2: Physiological evidence for a role in diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 302, 193–202.

Birchal, V.S., Passos, M.L., Wildhagen, G.R.S. and Mujumdar, A.S. (2005). Effect of Spray-Dryer Operating Variables on the Whole Milk Powder Quality. *Drying Technology* 23, 611–636.

Blanpain-Avet, P., Migdal, J.F., Bénézech, T. (2004). The effect of multiple fouling and cleaning cycles on tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate: Membrane performance and cleaning efficiency. *Food and bioproducts processing* 82, 231-243.

Brans, G., Schroën, C.G.P.H., van der Sman, R.G.M. and Boom, R.M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science* 243, 263–272.

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

Brennan, J.G. (2006). Evaporation and dehydration. In Brennan, J.G. (Ed.), *Spray drying in Food Processing Handbook*, First Edition. Wiley-VCH, Weinheim, pp 71-121.

Broncano, J.M., Otte, J., Petrón, M.J., Parra, V. and Timon, M.L. (2010). Isolation and identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented “chorizo” sausages. *Meat Science* 90, 494-501.

Bylund, G. (2003). Milk powder. In Teknotext AB (Eds.). *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Pp 361-374.

Cabero, M.L., Riera, F.A., Álvarez, R. (1999). Rising of ultrafiltration ceramic membranes fouled with whey proteins: effects on cleaning produces. *Journal of membrane science* 154, 239-250.

Cadée, J.A., Chang, C.Y., Chen, C.W., Huang, C.N., Chen, S.L. and Wang, C.K. (2007). Bovine Casein Hydrolysate (C12 Peptide) Reduces Blood Pressure in Prehypertensive Subjects. *American Journal of Hypertension* 20, 1–5.

Cadee, J.A. and Mallee, L.F. (2010). Peptides Inhibiting Angiotensin-Converting Enzyme. *US* 2010/0056458.

Cai, Y.Z. and Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science* 65, 1248–1252.

- Campbell, D.J. (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 784–791.
- Carretero, O.A. and Oparil, S. (2000). Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation* 101, 329-335.
- Chen, Y., Yang, Y., Liu, Y., Cahng, C.T., Feng, H.H. and Chen C.C, (2004). Peptides used as angiotensin converting enzyme inhibitor and preparation process thereof. US6767990
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Chiba, H. and Yoshikawa, M. (1991). Bioactive peptides derived from food proteins. *Kagaku to Seibutsu* 29, 454-458.
- Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 36, 883-892.
- Clare, D.A. and Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science* 83, 1187–1195.
- Collins, R. and MacMahon, S. (1994). Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *British Medical Bulletin* 50, 272-98.
- Contreras, M. del M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. and Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* 19, 566–573.
- Contreras, M. del M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J. and Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 44, 9–15.
- Coulter, D.M. and Edwards, I.R. (1987). Cough associated with captopril and enalapril. *British Medical Journal* 294, 1521–1523.
- Cui, Z.F., Bellara, S.R. and Homewood, P. (1997). Airlift crossflow membrane filtration – A feasibility study with dextran ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 128, 83.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20, 1637–1648.

Davis, M.E., Rao, A., Gauthier, S., Pouliot, Y., Gourley, L., and Allain A.F. (2001). Enzymatic treatment of whey proteins for the production of antihypertensive peptides, the resulting products and treatment of hypertension in mammals. Danisco International Foods. US 2005/000399 A9.

de Barros, S.T.D., Andrade, C.M.G., Mendesa, E.S. and Peres, L. (2003). Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 215, 213–224.

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

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., et al. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81 (SUPPL. 1).

Elisseeva, Y. and Kugaevskaya, E. (2009). Structure and physiological importance of angiotensin converting enzyme domains. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 3, 237–247.

Mancia, G., Laurent, S., Agabiti-Rosei, E., et al. (2009). Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Journal of Hypertension* 27, 2121–2158.

Favaro-Trindade, C.S., Santana, A.S., Monterrey-Quinter, E.S., Trindade, M.A. and Netto, F.M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids* 24, 336–340.

Fernández-Pérez, V., Tapiador, J., Martín, A. and Luque de Castro, M.D. (2004). Optimization of the drying step for preparing a new commercial powdered soup. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5, 361–368.

Ferreira, S.H. (2000). Angiotensin converting enzyme: History and relevance. *Seminars in Perinatology* 24, 7-10.

Field, R.W., Wu, D., Howell, J.A. and Gupta, B.B. (1995). Critical flux concept for microfiltration fouling. *Journal of Membrane Science* 100, 259-272.

Field, R.W., Wu, D., Howell, J.A., Gupta, B.B. (1996). Mass transport and the design of membrane system. In Scott, K. and Hughes, R. (Eds.), *Industrial Membrane Separation Technology*, Chapman & Hall, London.

Filková, I., Huang, L.X. and Mujumdar, A.S. (2006). Industrial Spray Drying Systems. In Mujumdar A.S. (Ed.), *Handbook of Industrial Drying, Third Edition - CRC Press Book/ Taylor & Francis Group*, Boca Raton, pp 215-254.

Fitzgerald, R.J. and Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84, S33-S37.

FitzGerald, R.J. and Murray, B.A. and Walsh, D.J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Nutrition* 134, 980–988.

Fluegel, S.M., Shultz, T.D., Powers, J.R., et al. (2010). Whey beverages decrease blood pressure in prehypertensive and hypertensive young men and women. *International Dairy Journal* 20, 753–760.

Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P.C., Duchateau, G.S. and Augustijns, P. (2008). The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides* 29, 1312–1320.

Frokjaer, S. (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technology* 48, 86-88.

Fujita, H., Eiichiyokoyama, K. and Yoshikawa, M. (2000). Classification and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins. *Journal of Food Science* 65, 564–569.

Garrett, D.A., Failla, M.L. and Sarama, R.J. (1999). Development of an in Vitro Digestion Method To Assess Carotenoid Bioavailability from Meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4301–4309.

Geerlings, A., Villar, I.C., Zarco, F.H., Sánchez, M., Vera, R., Zafra Gomez, A., Boza, J. and Duarte, J. (2006). Identification and Characterization of Novel Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Obtained from Goat Milk. *Journal of Dairy Science* 89, 3326–3335.

Gómez-Ruiz, J.A., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I. and Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 223, 595–601.

Grangeon, A. and Lescoche, P. (2000). Flat ceramic membranes for the treatment of dairy products: comparison with tubular ceramic membranes. *Lait* 80, 5.

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P. and Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica* 41, 79-89.

Guang, C. and Phillips R.D. (2009). Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5113–5120.

Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15, 155-170.

Hanif, K., Bid, H.K. and Konwar, R. (2010). Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertension Research*, 33, 11–21.

Harjanne, A. (1984). Automated kinetic determination of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clinical Chemistry* 30, 901–902.

Hartmann, R. and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 163–169.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. and 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, 767 –771.

Hayakari, M., Kondo, Y. and Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry* 84, 361–369.

He, H.L, Wu, H., Chen, X.L., Mei Shi, Xi-Ying Zhang, Sun, C.Y., Zhang, Y.Z. and Zhou, B.C. (2008). Pilot and plant scaled production of ACE inhibitory hydrolysates from *Acetes chinensis* and its in vivo antihypertensive effect. *Bioresource Technology* 99, 5956–5959.

Hennigs, C., Kockel, T.K. and Langrish, T.A.G. (2001) New measurements of the sticky behavior of skim milk powder. *Drying Technology* 19, 471–484.

Hérmia, J. (1982). Constant pressure blocking filtration laws. Applications to power—law non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Research and Design* 60, 183–187.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. and Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine [beta]-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine [beta]-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal* 12, 805–812.

Hernandez-Ledesma, B., Martin-Alvarez, P.J. and Pueyo, E. (2003). Assessment of the Spectrophotometric Method for Determination of Angiotensin-Converting-Enzyme Activity: Influence of the Inhibition Type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4175–4179.

Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I. and Bartolome, B. (2007). ACE-inhibitory and radical scavenging activity of peptides derived from b-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55, 3392-3397.

Hernández-Ledesma, B., Contreras, M, del M. and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165, 23–35.

Hirota, T., Ohki, K., Kawagishi, R., Kajimoto, Y., Mizuno, S., Nakamura, Y. and 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, 489–496.

Hogan, S.A. and O’Callaghan, D.J. (2010). Influence of milk proteins on the development of lactose-induced stickiness in dairy powders. *International Dairy Journal* 20, 212–221.

Holmquist, B., Bünning, P. and Riordan, J.F. (1979). A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry* 95, 540–548.

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29, 1062–1071.

Hyun, C. and Shin, H. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry* 36, 65–71.

Ishida, Y., Shibata, Y., Fukuhara, I., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L. (2011). Effect of an Excess Intake of Casein Hydrolysate Containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in Subjects with

Normal Blood Pressure, High-Normal Blood Pressure, or Mild Hypertension. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 427–433.

Jäkälä, P., Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals* 3, 251-272.

Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M. and 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, 1600–1605.

Jiang J, Chen S, Ren F, Luo Z, Zeng SS. Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*. 2007;74(1):18–25.

Jiang, Z., Tian, B., Brodtkorb, A. and Huo, G. (2010). Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chemistry* 123, 779–786.

Johnston, C.I. (1992). Renin-angiotensin system: A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of Hypertension* 10, S13-S26.

Kannel, W.B. (2000) Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Cardiology* 85, 251–255.

Kato, A. and Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 624, 13–20.

Kearney, P.M, Whelton M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K. and He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217–23.

Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J. and Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2992–2997.

Kim, I.Y. and de Weck, O.L. (2005). Adaptive weighted-sum method for bi-objective optimization: Pareto front generation. *Structural and Multidisciplinary Optimization* 31, 105-106.

- Kitts, D.D. and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309–1323.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P. and Tupasela, T. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agricultural and Food Science in Finland* 7, 283-296.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1297–1308.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1, 177–187.
- Knütter, I., Wollesky, C., Kottra, G., Hahn, M.G., Fischer, W., Zebisch, K., Neubert, R.H.H., Daniel, H. and Brandsch, M. (2008). Transport of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors by H⁺/Peptide Transporters Revisited. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 432–441.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D. (2011). Spray Drying of Chicken Meat Protein Hydrolysate: Influence of Process Conditions on Powder Property and Dryer Performance. *Drying Technology* 29, 163–173.
- Lee, K.J., Kim, S.B., Ryu, J.S., Shin, H.S. and Lim, J.W. (2005). Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from goat's milk casein hydrolysates. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 741–746.
- Lei, L., Sun, H., Liu, D., Liu, L. and Li, S. (2008). Transport of Val-Leu-Pro-Val-Pro in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3582–3586.
- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H. and Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 24, 469–486.
- Li, G.H., Liu, H., Shi, Y.H., Le, G.W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 219–224.

Lin, F., Chen, L., Liang, R., Zhang, Z., Wang, J., Cai, M. and Li, Y. (2011). Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects in vivo and in vitro. *Food Chemistry* 124, 801–807.

López-Fandiño, R., Otte, J. and van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 16, 1277–1293.

Lovsin Kukman, I., Zelenik Blatnik, M. and Abram, V. (1995). Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 704, 113-120.

Lu, J., Sawano, Y., Miyakawa, T., Xue, Y.L., Cai, M.Y., Egashira, Y., Ren, D.F. and Tanokura, M. (2010). One-Week Antihypertensive Effect of Ile-Gln-Pro in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 559–563.

Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T. (1996). Identification of an Antihypertensive Peptide from Casein Hydrolysate Produced by a Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 79, 1316–1321.

Mancia, G., Laurent, S., Agabiti-Rosei, E., et al. (2009). Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Journal of Hypertension* 27, 2121–2158.

Manso, M.A. and López-Fandiño, R. (2003). Angiotensin I Converting Enzyme-Inhibitory Activity of Bovine, Ovine, and Caprine k-Casein Macropeptides and Their Tryptic Hydrolysates. *Journal of Food Protection* 66, 1686–1692.

Martínez-Férez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C.A., Pohlentz, G., Boza, J.J., Guadix, E.M., Kunz, C. (2006). Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *International Dairy Journal* 16, 173–181.

Masuda, O., Nakamura Y. and Takano, T. (1996). Antihypertensive Peptides Are Present in Aorta after Oral Administration of Sour Milk Containing These Peptides to Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Nutrition* 126, 3063-3068.

Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K. and Kawasaki, T. (2002). Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 204–208.

Mao, X.Y., Ni, J.R., Sun, W.L., Hao, P.P. and Fan, L. (2007). Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chemistry* 103,1282–1287.

Maupoei, P.F., Grau, A.A., Sorolla, A.M.A. and Baviera, J.M.B. (2001). Secadores por atomización. In *Introducción Al Secado de Alimentos Por Aire Caliente*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

Miguel, M., Aleixandre, M.A., Ramos, M. and López-Fandiño, R. (2006). Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 726–731.

Minervini, F., Algaron, F. and Rizzello, C.G. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5297-5305.

Ming, L., Yi, S., Chi, L., Zheng, H., Li, Z., Deng, Y., Huang, J., Li, L. and Fang, H. (2011). Long-Term Antihypertensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptide LAP. *Kidney and Blood Pressure Research* 34, 358–364.

Mito, K., Fujii, M., Kuwahara, M., Matsumura, N., Shimizu, T., Sugano, S. and Karaki, H. (1996). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *European Journal of Pharmacology* 304, 93–8.

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

Muro-Urista, C., Álvarez-Fernández, R., Riera-Rodríguez, F., Arana-Cuenca, A., Téllez-Jurado, A. (2011). Review: Production and Functionality of Active Peptides from Milk. *Food Science and Technology International* 17, 293–317.

Murray, B.A., Walsh, D.J. and FitzGerald, R.J. (2004). Modification of the furanacryloyl--phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 59, 127–137.

Murray, B.A. and FitzGerald, R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design* 13, 773–791.

Nakagawa, Y. and Kitamura, S. (1989). Processes for producing milk-derived alcoholic beverages. The Calpis Food Industry. EP032383.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995). Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science* 78, 1253–1257.

Natesh, R., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D. and Acharya, K.R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 421, 551–554.

Nielsen, P.M. (1997). Functionality of protein hydrolysates. In Damadoran, S. and Paraf, A. (Eds.), *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, New York, Pp. 443-472.

Ondetti, M.A. and Cushman, D.W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry* 51, 283–308.

Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait* 87, 149–165.

Otani, H. and Hosono, A. (1989). Immunological properties of pepsin, trypsin and/or chymotrypsin digests of bovine α 1-casein. *Nippon Chikusan Gakkaiho* 60, 1143- 1150.

Otte, J., Shalaby, S.M.A., Zakora, M. and Nielsen, M.S. (2007a). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from $[\alpha]$ -lactalbumin and $[\beta]$ -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal* 17, 1460–1472.

Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H., and 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, 488–503.

Pan, D. and 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, 472–479.

Pan, D., Cao, J., Guo, H. and Zhao, B. (2012). Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry* 130, 121–126.

- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M. and Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88–113.
- Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C. and Martial-Gros, A. (2003). In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung/Food* 47, 87-94.
- Phelan, M. and Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food and Function* 2, 153–167.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 11, 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. and Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research* 67, 53–64.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. and Korhonen, H. (1998). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal* 8, 325–331.
- Pina, A.S. and Roque, A.C.A. (2009). Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Molecular Recognition* 22, 162–168.
- Pouliot, M., Pouliot, Y., Britten, M. (1996). On the conventional cross-flow microfiltration of skim milk for the production of native phosphocaseinate. *International Dairy Journal* 6, 105–111.
- Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepaniak, L. and Sørhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology* 219, 579–583.
- Pritchard, S.R., Phillips, M. and Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International* 43, 1545–1548.
- Punidades, P. and Rizvi, S.S.H. (1998). Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. *Food Research International* 31,265–272.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science* 88, 3480–3487.

Quirós, A., Contreras, M. del M., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30, 1848–1853.

Riordan, J. (2003). Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology* 4, 225.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W. and Zaloga, G.P. (1999). Effect of Chain Length on Absorption of Biologically Active Peptides from the Gastrointestinal Tract. *Digestion* 60, 332–337.

Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M. and Juillerat, M.A. (2004). Identification of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Sodium Caseinate Hydrolysates Produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6923–6931.

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

Rogalewicz, F., Hoppilliard, Y. and Ohanessian, G. (2000). Fragmentation mechanisms of α -amino acids protonated under electrospray ionization: a collision activation and ab initio theoretical study. *International Journal of Mass Spectrometry* 195/196, 565-590.

Ruilope, M.L. (1999). The Kidney as Part of the Cardiovascular System. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33, S7-S10.

Ruiz-Giménez, P., Salom, J.B., Marcos, J.F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Torregrosa, G., Alborch, E. and Manzanares, P. (2012). Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry* 131, 266–273.

Rupley, J.A. (1967). Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Methods in Enzymology* 11, 905-917.

Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. (2011). Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* 3, 765–791.

Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. In Bosze, Z. (Ed.), *Bioactive Components of Milk*. Springer, New York, Pp 295–317.

- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S. (1994). Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58, 1767–71.
- Sakaguchi, M., Ishikawa, C., Nishimura, T., Sugihara, E. and Matsumura, E. (2004). Neurite outgrowth-stimulating peptide derived from bovine kappa-casein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 2653–2655.
- Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M. del M., Carróna, R., Recio, I., Monteroa, M.J. and Sevilla, M.A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological Research* 63, 398–404.
- Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., Nakagawa, S., Kajimoto, Y. and Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of Medicinal Food* 8, 423–430.
- Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, S. Arai and M. Shimizu, M. (2002). Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 378–384.
- Schlimme, E. and Meisel, H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung/Food* 39, 1-20.
- Schmidl, M.K., Taylor, S.L. and Nordlee, J.A. (1994). Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technology* 48, 77–85.
- Schlothauer, R., Schollum, L.M., Reid, J.R., Harvey, S.A., Carr, A.J., Fanshawe, L.F. (2006). Bioactive whey protein hydrolysate. US7148032
- Sentandreu, M.A. and Toldra, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry* 97, 546-554.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. and Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 326–330.
- Shah, T.N., Foley, H.C. and Zydney, A.L. (2007). Development and characterization of nanoporous carbon membranes for protein ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 295, 40-49.

Shalaby, S.M., Zakora, M. and Otte, J. (2006). Performance of Two Commonly Used Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Assays Using FA-PGG and HHL as Substrates. *Journal of Dairy Research* 73, 178–186.

Sibony, M., Gasc, J., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F. and Corvol, P. (1993). Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 21, 827–835.

Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B. and Wechsler, D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology* 90, 47–73.

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

Sipos, T. and Merkel, J. R. (1970). An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin *Biochemistry* 9, 2766-2775.

Skrbic, R. and Igic, R. (2009). Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides* 30, 1945–1950.

Steinhardt, J. and Beychock, S. (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. In Neurath, H. (Ed.), *The Proteins*. Academic Press, New York, Pp 139-304.

Svendsen, I. (1976). Chemical modifications of subtilisins with special preference to the binding of large substrates. A review. *Carlsberg Research Communications* 41, 237-291.

Sturrock, E.D., Natesh, R., Rooyen, J.M. and Acharya, K.R. (2004). What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61, 2677–2686.

Takano, D.T. (2002). Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 333–340.

Tavares, T., Contreras, M. del M., Amorim, M., Pintadoa, M., Recio, I. and Malcata, F.X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides* 32, 1013–1019.

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

Telang, A.M. and Thorat, B.N. (2010). Optimization of Process Parameters for Spray Drying of Fermented Soy Milk. *Drying Technology* 28, 1445–1456.

Tolton II, K.J., Nimmagudda, R., Braun, S.D., Primmer, M. and Van Der, V.F. (2003). Method of preparing a casein hydrolysate enriched in anti-hypertensive peptides. US6514941.

Tonon, R.V., Brabet, C. and Hubinger, M.D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* 88, 411–418.

Tossavainen, O., Suomalainen, T., Sahlstein, J. and Mäyrä-Mäkinen, A. (2005) Process for producing a product containing antihypertensive tripeptides. US6972282.

Touyz, R.M. (2005). Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: Role of angiotensin II. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 14, 125-131.

Tsopma, A., Romanowski, A., Banda, L., Lavoie, J.C., Jenssen, H. and Friel, J.K. (2011). Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry* 126, 1138-1143.

Tuncturk, Y. and Zorba, O. (2006). The effects of enzymatic hydrolysis of casein on apparent yield stress and some emulsion properties: Part Special issue: WCFS Food Summit. *Food Hydrocolloids* 20, 475-482.

Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M.L, Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L. and 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, 795–802.

Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. and Voragen A. (2002). Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal* 12, 813–820.

Vercruyssen, L., Van Camp, J. and Smagghe, G. (2005). ACE Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Animal Muscle Protein: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8106–8115.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2002a) Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51, 75–87.

Vermeirssen, V., Deplancke, B., Tappenden, K.A., Van Camp, J., Gaskins, H.R., Verstraete, W. (2002b). Intestinal Transport of the Lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe Monolayer. *Journal of Peptide Science* 8, 95–100.

Vermeirssen, V., Camp, J.V. and Verstraete, W. (2004). Bioavailability of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *British Journal of Nutrition* 92, 357–366.

Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Dua, Y., Miyaguchi, Y. and Lin, B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 111, 302–308.

World Health Organisation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. A Report of a Joint World Health Organisation / Food and Agriculture Organisation Expert Consultation. Geneva, WHO 2003.

World Health Organisation. 2011. Cardiovascular diseases (CVDs). [HTTP://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html). Fecha de último acceso 04/11/2012.

Wroblewska, B., Karamac, M., Amarowicz, R., Szymkiewicz, A., Troszynska, A. and Kubicka, E. (2004). Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 839-850.

Wu, J., Aluko, R.E. and Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*. 950, 125–130.

Wu, J., Aluko, R.E. and Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *QSAR & Combinatorial Science* 25, 873-880.

Wu, J., Muir, A.D., Aluko, R.E. (2009). Ace inhibitory peptides from plant materials. US 7566690

Xu, R.J. (1998). Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International* 14, 1-16.

Xu, J.Y., Qin, L.Q., Wang, P.Y., Li, W. and Chang, C. (2008). Effect of milk tripeptides on blood pressure: A metaanalysis of randomized controlled trials. *Nutrition* 24, 933-940.

Yang, Y., Marczak, E.D., Yokoo, M., Usui, H. and Yoshikawa, M. (2003). Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4897–4902.

Yin, J., Diao, Y., Wen, Z., Wang, Z. and Li, M. (2010). Studying Peptides Biological Activities Based on Multidimensional Descriptors (E) Using Support Vector Regression. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 16, 111–121.

Yoo, S.H., Jayaprakasha, H.M., Lee, S.Y., Paik, H.D. and Yoon, Y.C. (2009). Effects of processing parameters of spray drying on some of the quality attributes of whey protein concentrate hydrolysates. *Milchwissenschaft* 64, 78–81.

You, S.J. and 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, C801–C807.

14. Summary of the thesis

14.1. INTRODUCTION

Hypertension is a serious health problem, indeed is the main risk factor of cardiovascular diseases which are responsible of over a quart of the world deaths. Angiotensing converting enzyme (ACE) is a key piece in the blood pressure regulation since it produces angiotensing II (a vasoconstrictor) and degrades bradykinin (a vasodilator). Some food-derived peptides have shown the capacity of inhibiting ACE, and therefore they may be able to reduce blood pressure. Active peptides have been found in proteins from several food sources such as milk, fish, meat, eggs, vegetables or cereals. In particular, milk proteins are the most important source of ACE inhibitory peptides. Goat milk is not so well studied as bovine milk but recently it has also been shown as a good source of inhibitory peptides. These active peptides are encrypted within the proteins and should be released by hydrolysis or fermentation. Enzymatic hydrolysis allows produce peptides in soft conditions of pH and temperature. Moreover, it is possible to control the hydrolysates properties using the specificity of enzymes.

ACE inhibitory peptides should reach their target in an active form. Enzymes present in the organism could degrade the peptides during their gastrointestinal digestion, intestine absorption or blood transport, making them loose their inhibitory activity. Both in vitro and in vivo assays can be done to prove the antihypertensive effect of the food derived peptides. Side-effects have not been detected in humans for ACE inhibitory peptides with in vivo activity. Therefore they could be used in food formulas to help people with hypertension.

The main objective of this doctoral thesis was to produce hydrolysates from goat milk protein with ACE inhibitory activity. The production process was studied by completing the following stages:

- Optimization of the hydrolysis of goat milk
- Fractionation of goat milk proteins with membranes
- Study of the influence of substrate and enzyme on the ACE inhibitory activity
- Characterisation and identification of ACE inhibitory peptides
- Simulated digestion of ACE inhibitory peptides
- Purification of ACE inhibitory peptides with membranes
- Spray drying of ACE inhibitory peptides

14.2. MATERIALS AND METHODS

14.2.1. Materials

Subtilisin and trypsin from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) were the enzymes selected for the hydrolysis. Both enzymes have adequate specificity for the production of ACE inhibitory peptides.

Commercial UHT goat milk was skimmed by centrifugation and used as substrate. Also, in order to study each fraction separately, the skimmed goat milk was fractionated into caseins and whey protein by ultrafiltration through 0.14 μm membranes.

14.2.2. Filtration

Tubular ceramic membranes (TAMI Inside Céram; Nyons, Francia) were used (Table 14.1). The molecular weight cut off employed were 0.14 μm for separating milk fractions and 50, 15 and 3 kDa for purifying the hydrolysates.

Table 14.1. Technical specifications of ceramic membranes used.

Membrane	Nº Channels	Length (m)	Filtration Area (m^2)	Hydraulic diameter (mm)	Membrane permeability ($\text{kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)
0.14 μm	3	1.2	0.045	3.6	0.3624
50 kDa	3	0.25	0.0094	3.6	0.1208
15 kDa	3	0.25	0.0094	3.6	0.0420
3 kDa	1	0.25	0.0042	6	0.0238

The experimental rig (Figure 14.1) consisted of a feed tank (1) immersed in a thermostatic bath at 50°C. The temperature inside the tank is controlled by a temperature probe (8). A positive displacement pump (Procon, Murfreesboro, USA) (2) flows the feed through the membrane (4). The pressure was controlled by one back-pressure valve (6) and measured by two manometers located before and after the membrane (3, 5). The flow was measured with a flowmeter (7).

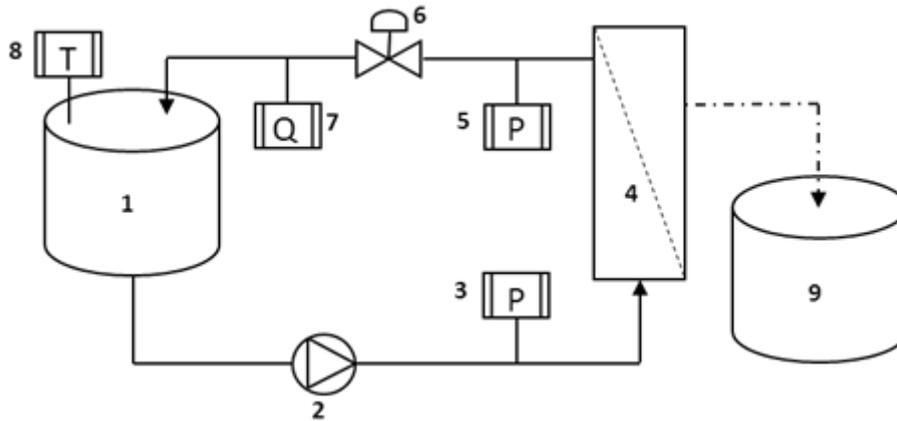


Figure 14.1. Experimental rig for filtration.

In order to study the fouling process, the experimental data was adjusted to fouling models. Following the general mathematical model for fouling in cross-flow filtrations proposed by Field (1995):

$$-\frac{dJ}{dt}(J^{n-2}) = k(J - J^*)$$

it is possible to study complete pore blocking ($n=2$), internal pore blocking ($n=1.5$), partial pore blocking ($n=1$) and cake formation ($n=0$).

After each filtration the membrane was cleaned with a solution of 20 g/L NaOH and 2g/L of sodium dodecyl sulfate (SDS) and rinsed with demineralised water several times to remove the cleaning agent. The efficiency of the cleaning (E) is a measurement of the membrane recovery.

$$E = \frac{(R_0 - R_{NaOH})}{(R_0 - R_M)} \cdot 100$$

where R_M is the intrinsic resistance of the membrane (the inverse of permeability), R_0 is hydraulic resistance after the filtration and R_{NaOH} is the hydraulic resistance after the cleaning.

14.2.3. Hydrolysis

Depending on the required volume of substrate, the reaction was carried out in a 250 mL jacketed reactor connected to a thermostatic bath or in a 3L tank immersed in a thermostatic bath. Both reactions took place at 50°C employing proper stirring. The reactions were monitored by means of an automatic titrator, which adds NaOH to keep pH constant. According to the pH-stat method, the degree of hydrolysis was determined by:

$$DH = \frac{V_B \times N_B}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

where DH is the ratio between the number of peptide bonds cleaved and the number of peptide bonds in the substrate, N_B and V_B are the normality and the volume of NaOH consumed to keep pH constant, α is the average degree of dissociation of α -NH₂ groups released during hydrolysis, m_p is the mass of protein in the substrate and h_{TOT} is the amount of peptide bonds per mass unit of protein.

After completing the reaction time, the enzyme was deactivated by heating. Subsequently, the hydrolysates were cooled and stored at 4°C or frozen at -20 °C until performing further analysis.

14.2.4. ACE inhibitory activity

Two in vitro assays were employed to determine the inhibitory activity:

- 1) Spectrophotometric assay (Shalaby et al., 2006), based on the linear decrease of absorbance (340 nm) observed during the hydrolysis of the tripeptide N - [3-(2- N-[3-(2-Furyl)acryloyl]- L -phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG) with ACE. The slope of this descent is related to the enzymatic activity of ACE and is less pronounced in the presence of an inhibitor. The reaction was carried out in a 96-well microplate at 37 °C.
- 2) A variation of the fluorometric method developed by Sentandreu and Toldra (2006), based on the increase in fluorescence originated when ACE cleaves the substrate o-amino-benzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-proline (ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro) (Bachem, Bubendorf, Switzerland). The assay was performed in 96-well black microtiter plates at 37°C.

In both assays, the percentage of ACE inhibition is calculated taking into account that the slope of the control sample (pure water) corresponds with 100% enzyme activity. Samples were analyzed in triplicate. The parameter IC₅₀ is used to compare samples with different concentrations and is defined as the amount of inhibitor reducing the enzyme activity to 50%.

14.2.5. Protein determination

The Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used to determine the protein content of substrates (milk, retentate and filtrate) and hydrolysates (fresh, freeze-dried, digested and spray-dried). The protein content of SEC

fractions was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) according to the kit instructions. The samples were analysed in triplicate.

14.2.6. Fractionation by size exclusion chromatography

Lyophilized hydrolysates were dissolved in 0.1 M ammonium hydrogen carbonate and fractionated by size exclusion chromatography (SEC) using an FPLC system (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) mounted with a column packed with Superdex™ 30 prep grade gel filtration resin (2.6 x 61 cm; Amersham Biosciences, Hillerød, Denmark). Five milliliters of a hydrolysate solution (70 mg protein/mL) were injected. The effluent was monitored at 280 nm and fractions of 10 mL were collected and then pooled according to the elution profile and frozen until analysis.

The elution times of 8 standards with different molecular weights (BSA, Cytochrome C, Insulin, Insulin B chain oxidized, angiotensin I, Leu-Enkephalin, Gly-Tyr and L-Trp) were used to make a calibration curve to determine the size range of the peptides in each fraction.

14.2.7. Peptide profiles and LC-MS analysis

Peptide profiles were revealed by LC-MS/MS analysis using an Agilent 1100 LCMSD Trap. The freeze dried hydrolysates were dissolved at 20 mg/mL in water and 5 µL were injected. From the fractions obtained after SEC a volume of 25 µL was injected. The identifications of the selected peptides of each fraction were carried out using Bruker Daltonics BioTools software 3.0.

14.2.6. Simulated digestion

The simulated digestion was fulfilled in a 250 mL jacketed reactor connected to a thermostatic bath (37 °C). Two kind of digestion were studied:

- Gastric digestion only: the sample solution (10 mg protein/mL) was hydrolysed with pepsin (Merck, Darmstadt, Germany) at pH 2 with an E/S ratio of 4%. After 1 hour 0.9 M NaHCO₃ was added, which increased the pH until 5.3.
- Complete gastrointestinal digestion: after gastric digestion, pancreatin (Sigma-Aldrich, USA) was incorporated to the reactor (E/S = 4%) and pH was raised to pH 7.5 with 1M NaOH. The reaction was developed for 2 hours.

14.2.7. Spray drying

A lab scale spray dryer (Büchi 190, Flawill, Switzerland) was used to stabilise the hydrolysates. The drying process was always carried out at 25 Nm³/h of air flow and the nozzle was fed with 600 L/h of compressed air. The influence of inlet air temperature and feed flow were studied in an experimental design. The resulting powder is recovered by a cyclone separator. Humidity measurements were performed with infrared balance (AD-4714A, A and D, Tokyo, Japan)

14.3. OPTIMIZATION OF THE HYDROLYSIS OF GOAT MILK GOAT MILK HYDROLYSIS

Response surface methodology (RSM) was used to generate a model explaining the influence of temperature (T) and enzyme substrate ratio (ES) in the degree of hydrolysis (DH) and ACE inhibitory activity (ACEI). It was studied for the hydrolysis of skimmed goat milk using subtilisin (S) and trypsin (T) as enzymes.

The models for DH adjusted considerably well the experimental data, obtaining correlation coefficients of 0.963 and 0.950 for subtilisin and trypsin respectively. According to contour plots (Figure 14.2), for both enzymes DH increased with ES. The same behavior was detected in trypsin hydrolysis by increasing T, in contrast employing subtilisin an optimum value of T was detected.

The maximum DH obtained for subtilisin was 0.218, reached at 60.5 °C and ES of 5%, while the maximum DH for trypsin hydrolysis was 0.159, obtained at the higher T and ES assayed.

On the other hand, the goodness of fit of the models obtained for ACEI were lower than previous: 0.648 and 0.694 for subtilisin and trypsin, respectively. However, both models were significant ($p < 0.001$), therefore the changes observed were significantly related to changes in T and ES. Regarding the effect of T and ES on ACEI (Figure 14.3), it could be concluded that T had an optimal value for maximizing ACEI in subtilisin hydrolysis while the best T for trypsin is the lowest assayed. With respect to the ES, the highest ES (5%) maximized ACEI for subtilisin, on the contrary the lowest value of ES (1%) gave the better inhibition for trypsin. The optimal values of ACEI were 0.325 and 0.399 for subtilisin and trypsin hydrolysates respectively.

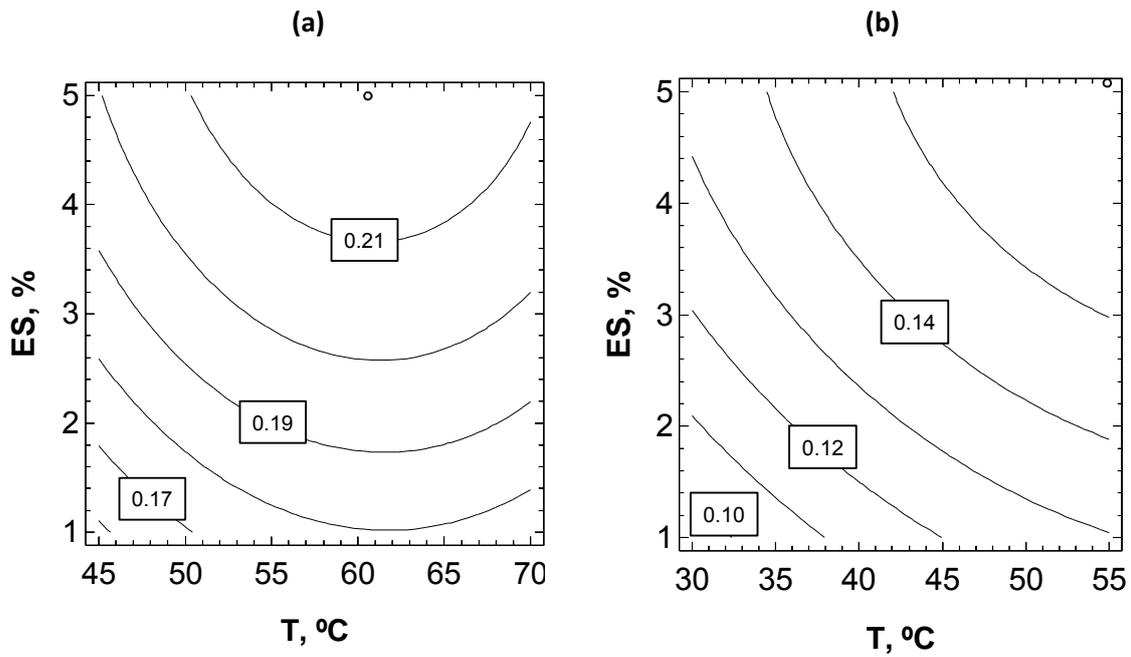


Figure 14.2. Contour plots for DH of subtilisin (a) and trypsin (b) hydrolysis.

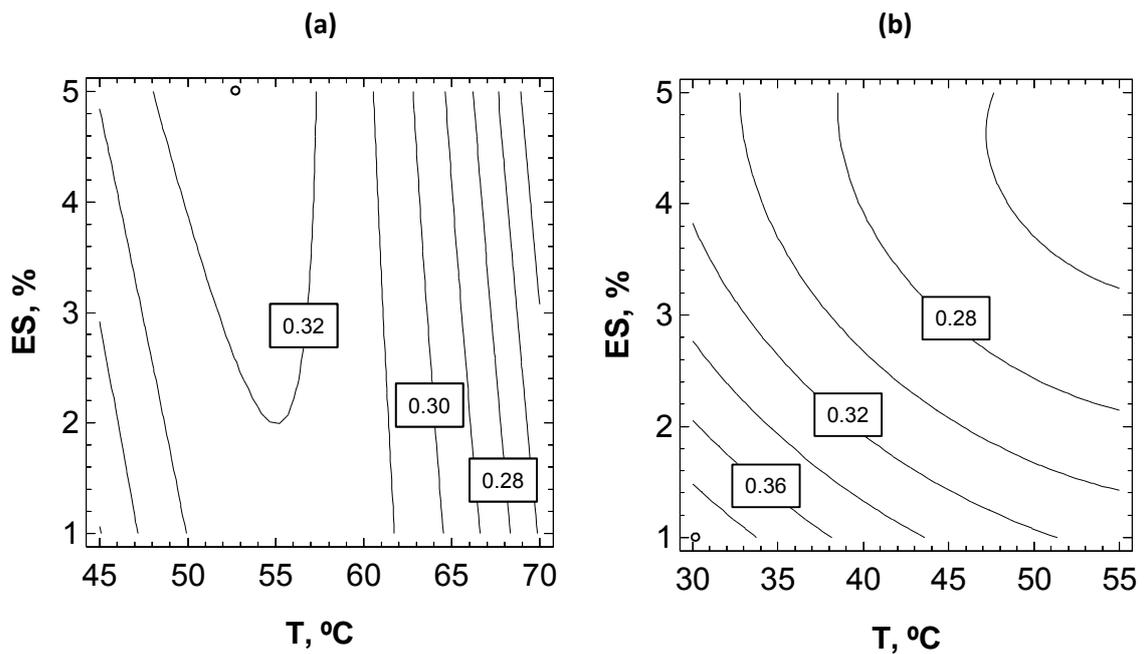


Figure 14.3. Contour plots for ACEI of subtilisin (a) and trypsin (b) hydrolysis.

In order to find the operational conditions which maximizes DH and ACEI simultaneously, the sum-weight method was used for such bi-objective optimisation. In this method, the weigh factor (α) represents the relative importance attached to the DH with respect to the ACEI, for each given value of α , a non-inferior solution was determined. In Figure 14.4, it is represented the DH and ACEI optimal values obtained for each α .

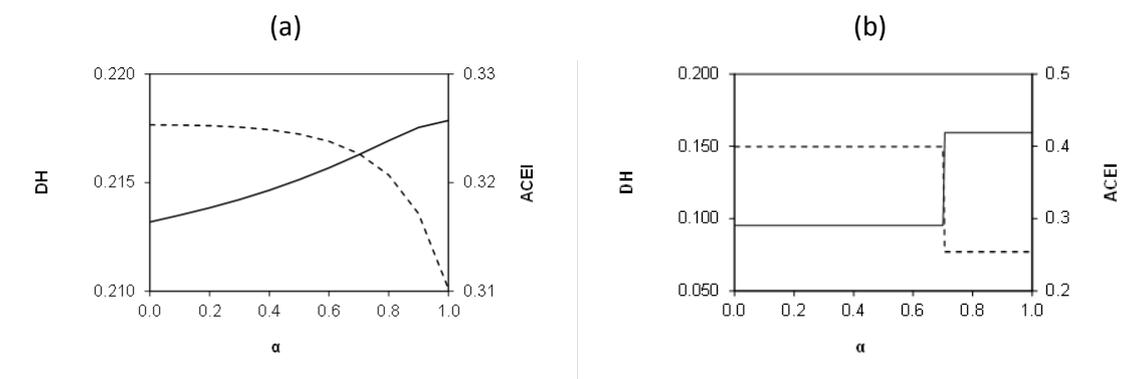


Figure 14.4. Set of optimal values of DH (solid line) and ACEI (dotted line) for subtilisin (a) and trypsin (b) as a function of the weight factor.

For subtilisin, $\alpha=0.6$ would be recommendable since upper values produced a considerable reduction in DH with little improvement of ACEI. In the case of trypsin, there were only two optimum solutions. Taking into account the advantages of working at low T and ES and the ACEI values obtained, $\alpha=0$ would be preferable in this case.

14.4. FRACTIONATION OF GOAT MILK PROTEINS WITH MEMBRANES

With the objective of studying separately the hydrolysis of caseins and whey protein, the skimmed goat milk was filtered through a tubular membrane with a pore size of $0.14 \mu\text{m}$ until a concentration factor of 3. The caseins remained in the retentate reaching a concentration of 63.5 g/L , while the whey protein were mainly recovered in permeate with a concentration of 3.15 g/L . Complete pore blocking seemed to be the fouling mechanism ($R^2 = 0.9966$). During the process, the permeate flow decreased almost 70%. However the cleaning step allowed to recover the membrane with a cleaning efficiency of 99.3%.

14.5. STUDY OF THE INFLUENCE OF SUBSTRATE AND ENZYME ON THE ACE INHIBITORY ACTIVITY

Skimmed goat milk, casein fraction and whey protein fraction were hydrolysed by three different treatments: hydrolysis with subtilisin (S), trypsin (T) and the combination of both (ST). All the hydrolysis curves (Figure 14.5) presented an initial linear zone of constant reaction rate. After 20 minutes, the rate decreased and the curve became asymptotic. The highest DH values were always obtained with the ST treatment, whereas trypsin gave the lowest DH in all substrates.

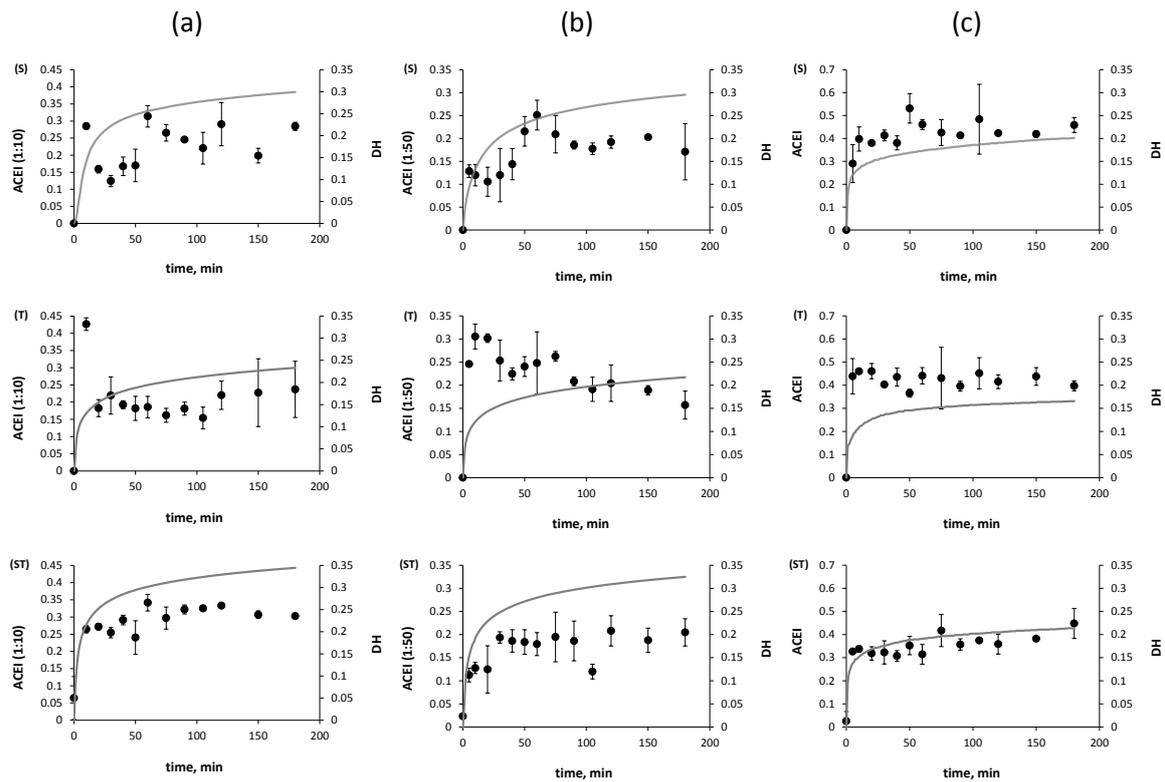


Figure 14.5. ACEI (dot) and DH (line) evolution during the hydrolysis of milk (a), retentate (b) and permeate (c) using subtilisin (S), trypsin (T) or a mixture of both (ST).

With an ACEI of original milk protein of zero, the inhibitory activity increased when enzymes started to break the peptide chain. When subtilisin was employed (S and ST), after an initial increase, ACEI remained constant. That would be explained since although active peptides could be degraded, new inhibitory peptides would be released. When trypsin is employed isolatedly, ACEI slightly decreased with time. The numbers of trypsin's attackable bonds are lower; therefore it would be more difficult to generate new inhibitory peptides to offset the loss of active peptides.

14.6. CHARACTERISATION AND IDENTIFICATION OF ACE INHIBITORY PEPTIDES

Hydrolysates from the previous stage were analysed in order to characterise the active fractions and identify some of the peptides present. Both low ACEI values and precipitation problems suggested the rejection of the permeate samples. ACEI and peptide profile of retentate and hydrolysates were quite similar. However, retentate was a more interesting substrate since its caseins concentration was higher.

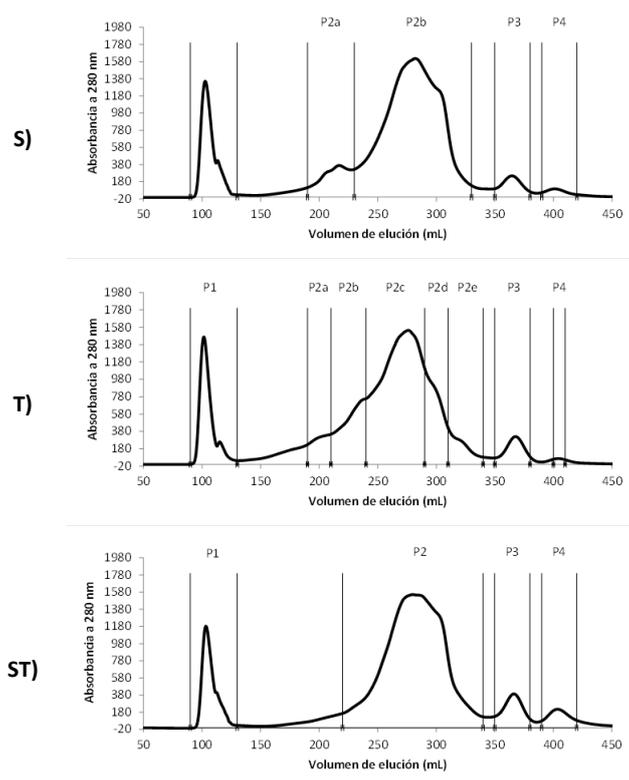


Figure 14.6. Size exclusion chromatograms for the hydrolysate produced with subtilisin (S), trypsin (T) or the mixture of both (ST).

The size exclusion chromatograms of the retentate hydrolysates (Figure 14.6) showed four peaks. The strongest inhibitory activity was detected in the smallest fractions, mainly in P2 and P4 fractions, which generally had a molecular weight below 2.3 kDa. According to protein concentration, most of the active peptides were within P2 fractions. However, P4 fractions presented the best inhibitory activity in all the treatment with IC_{50} values between 9.29 and 5.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The most interesting fractions obtained by SEC were analyzed by RP-HPLC-MS/MS. The experimental masses of the peptides were determined by Data Analysis software and it was possible to identify the sequences of the main peptides in each fraction. Some of peptides identified in P2 (Table 14.2) have been reported previously as ACE inhibitors, i.e. LHLPLPL, HLPLPL and EMPFPK. Other peptides, such as VLPVPK, YPVEPF, YPSYGLNYY, VVAPFPEVF and FVVAPFPEVF present practically the same sequence as other active peptides. One isolated peptide was found in P4 fractions. Based on its high UV-absorbance and its long retention time in SEC and in RP-HPLC and taking into account its fragmentation during the LC-MS analysis, the peptide in P4 could be WY, which has also been referred in the literature.

Table 14.2. Identified peptides in P2 fractions of retentate hydrolysates.

Mass [M+H] ⁺	Fraction	Retention time (min)	Possible peptide	Mass calc.(M+H)	Score	Origin
459.3	R-T-P2d	23.8	n.i. ¹			
553.3	R-T-P2d	30.0	n.i.			
496.5	R-T-P2d+e	33.9	n.i.			
696.6	R-T-P2d	36.6	VPNSAE(1P) ²	696.7	96	α_{s1} -CN f72-77
648.7	R-T-P2d	39.9	n.i.			
667.5	R-T-P2c + d	44.2	n.i.			
803.0	R-T-P2b + c	55.0	LHLPLPL	802.5	130	β -CN f133-139
1140.6	R-T-P2d+e	42.0	YPSYGLNYY ²	1140.2	322	κ -CN f35-43
799,7	R-T-P2d	44.9	FLPYPY	799.4	64	κ -CN f55-60
814.9	R-T-P2d	50.4	n.i.			
598.6	R-ST-P2, R-S-P2b, R-T-P2b+c	25.1	TGPIP N	598.7	65	β -CN f63-68
652.7	R-STP2, R-S-P2b, R-TP2b	32.6	VLPVPQ ²	652.4	47	β -CN170-175
748,8	R-ST-P2, R-T-P2c	35.0	EMPFPK	748.9	92	β -CN f108-113
751.5	R-ST-P2, R-T-P2c	40.0	YPVEPF	751.9	65	β -CN f114-119
690.0	R-ST-P2, R-S-P2b, R-T-P2b+c	48.5	HLPLPL	689.9	63	β -CN f134-139
978.0	R-ST-P2, R-T-P2b	37.0	n.i.			
995.1	R-T-P2b	51.0	n.i.			
1005.0	R-T-P2b+c	54.1	VVAPFPEVF	1005.2	79	α_{s1} -CN24-32
1152.1	R-T-P2b+c	59.0	FVVAPFPEVF	1152.4	350	α_{s1} -CN23-32

¹n.i. = could not be identified in the sequences used

²This sequence is uncertain

14.7. SIMULATED DIGESTION OF ACE INHIBITORY PEPTIDES

Retentate hydrolysates (R-S, R-T and R-ST) were subjected to in vitro digestions using gastrointestinal enzymes. The IC₅₀ values of initial hydrolysates and digested hydrolysates are presented in Figure 14.7. Stomach digestion with pepsin improved slightly the IC₅₀ values, but this was statistically significant only in R-S. However, when the complete digestion (pepsin + pancreatin) was performed the inhibitory activity of hydrolysates decreased. This worsening was significant in trypsin hydrolysates which suffered an increased upper than 50% in IC₅₀ value. In contrast, the variations detected in R-ST were no statistically significant. Therefore,

the inhibitory peptides present in R-ST resisted in vitro digestion without loss of inhibitory activity.

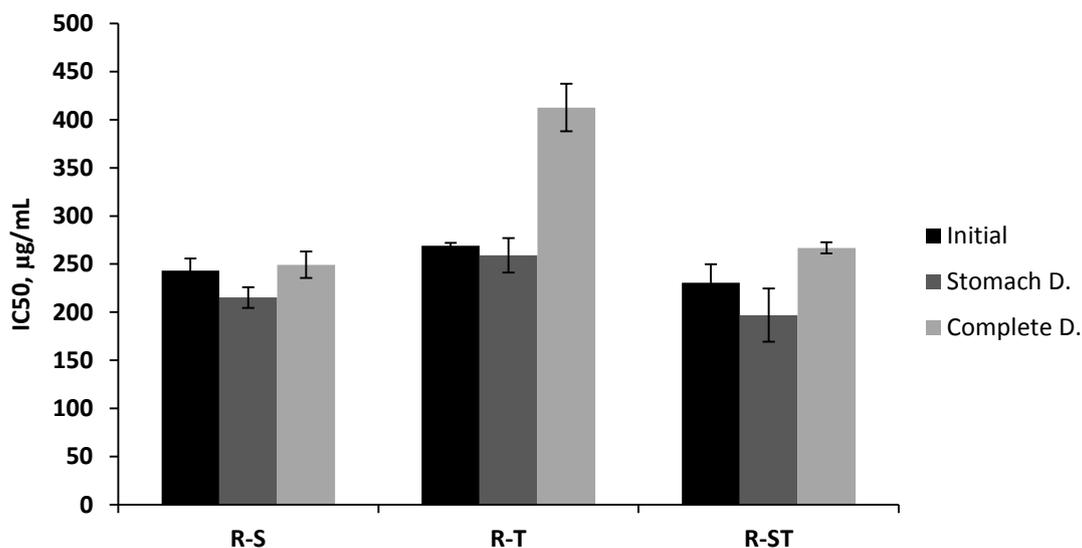


Figure 14.7. ACE inhibitory activity of hydrolysates before and after the in simulated stomach digestion and complete digestion.

14.8. PURIFICATION OF ACE INHIBITORY PEPTIDES WITH MEMBRANES

The retentate hydrolysate produced with subtilisin and trypsin simultaneously was selected to study the purification process with ceramic membranes. Two strategies consisting in two filtration stages were proposed. A filtration through 50 kDa or 15 kDa membranes were set as a first step, which were followed by a second filtration step of 3 kDa. In both strategies, the permeate flow decreased continuously during operational time, reaching losses of flow around 60% and 39% for the first and second stages respectively (Figure 14.8 and Figure 14.9).

The fouling processes of both 50 and 15 kDa membranes were adjusted to a complete pore blocking model (Figure 14.8) with a correlation coefficient of 0.9966 and 0.9849 respectively.

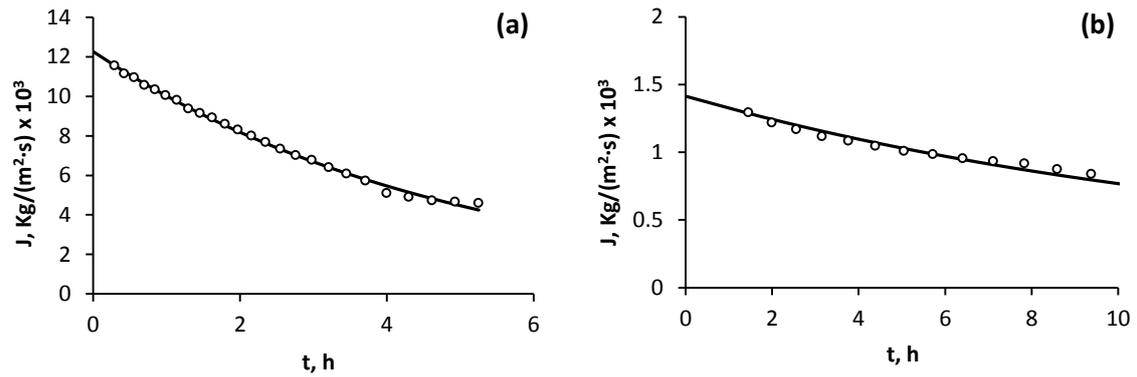


Figure 14.8. Experimental data (dot) and complete pore blocking model (line) for 50 kDa (a) and 15 kDa (b) membranes.

On the other hand, the data from the two 3 kDa filtrations were adequately adjusted to a partial pore blocking model (Figure 14.9). The goodness of fit was 0.9967 and 0.9906 for the strategy I and II, respectively.

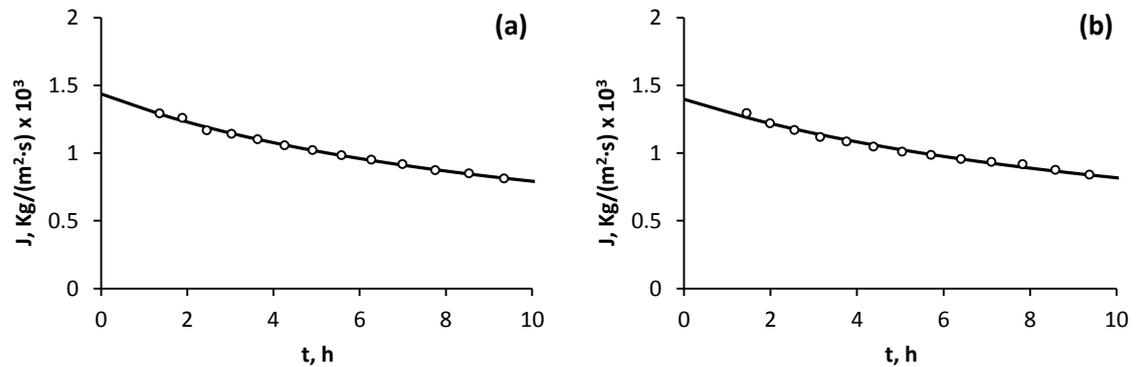


Figure 14.9. Experimental data (dot) and partial pore blocking model (line) for 3 kDa membranes of strategy I (a) and strategy II (b).

The fouling produced during the filtration was effectively removed with the cleaning process employed as can be checked in Table 14.3. After the filtration, the resistances were much higher because of fouling, but after the cleaning membranes recovered resistances similar to they had initially. The cleaning efficiency was always above 95%.

Table 14.3. Resistances and efficiency index for membrane cleaning process.

Strategy	Membrane	A_F, m^2	Stage	R_T ($bar \cdot m^2 \cdot s/kg$)	R_F ($bar \cdot m^2 \cdot s/kg$)	%E
I	50 kDa	0.0094	Initial	8.2761	0	97.6%
			Post filtration	18.8608	10.5847	
			NaOH	8.5334	0.2573	
	3 kDa	0.0042	Initial	42.0441	0	97.2%
			Post filtration	72.7811	30.7370	
			NaOH	42.9138	0.8698	
II	15 kDa	0.0094	Initial	23.8112	0	99.1%
			Post filtration	46.3632	22.5520	
			NaOH	24.0042	0.1930	
	3 kDa	0.0042	Initial	42.0441	0	96.5%
			Post filtration	67.1533	25.1093	
			NaOH	42.9138	0.8698	

As it is shown in Table 14.4, the first filtration stage generated an increment in protein concentration in retentate. The no-active peptides were concentrated in retentate elevating considerably the IC_{50} . In contrast, permeate fractions of 50 and 15 kDa membranes improved their IC_{50} with respect to the feed in 30.7 and 15.7 % respectively. The filtration through 3 kDa did not improve the ACE inhibitory activity of the fractions.

Table 14.4. Protein content and IC_{50} values of streams in filtrations of hydrolysates.

Strategy	Membrane	Stream	Protein (g/L)	Variation of IC_{50}
I	50 kDa	Feed	43.97	
		Retentate	73.80	100.2%
		Permeate	27.16	-30.7%
	3 kDa	Feed	27.16	
		Retentate	27.77	27.9%
		Permeate	30.32	3.4%
II	15 kDa	Feed	41.71	
		Retentate	72.77	88.3%
		Permeate	33.07	-15.7%
	3 kDa	Feed	33.07	
		Retentate	36.95	27.4%
		Permeate	32.66	-2.9%

According to these results, 50 kDa filtration was selected as the best strategy to purify the active peptides.

14.9. SPRAY DRYING OF ACE INHIBITORY PEPTIDES

As it was made in the purification study, retentate hydrolysates were selected to study their stabilisation by spray drying. The effects of inlet air temperature (T) and feed flow (Q) in the outlet temperature (Ts), powder yield (R), humidity (H) and ACE-inhibitory activity (ACEI) of dried hydrolysates were determined.

The outlet temperature was modeled correctly ($R^2 = 0.980$) with a quadratic equation. The variation of Ts with T and Q is shown in Figure 14.10: Ts increased when rising T and/or decreasing Q. The obtained contour plot allows determining the operational condition to avoid undesirable values of Ts which could originate degradation in the final product.

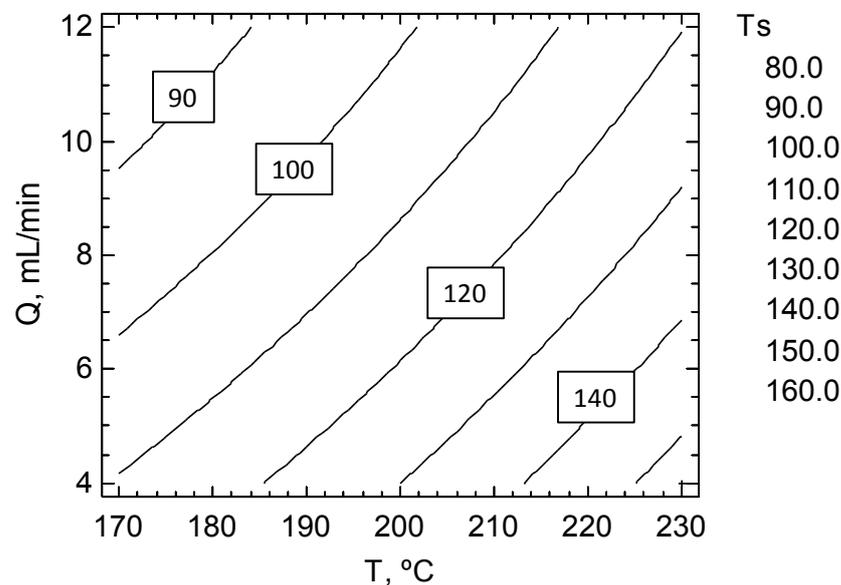


Figure 14.10. Contour plot of the outlet air temperature (Ts).

The yield of the process was defined as the percentage of solids present in the feed which were recovered as powder. As before, the model proposed fitted the experimental data properly ($R^2 = 0.8859$). As is indicated in Figure 14.11, an increase in T was always detrimental to yield. There was an optimum of 38.4% at 170°C and 4.35 mL/min.

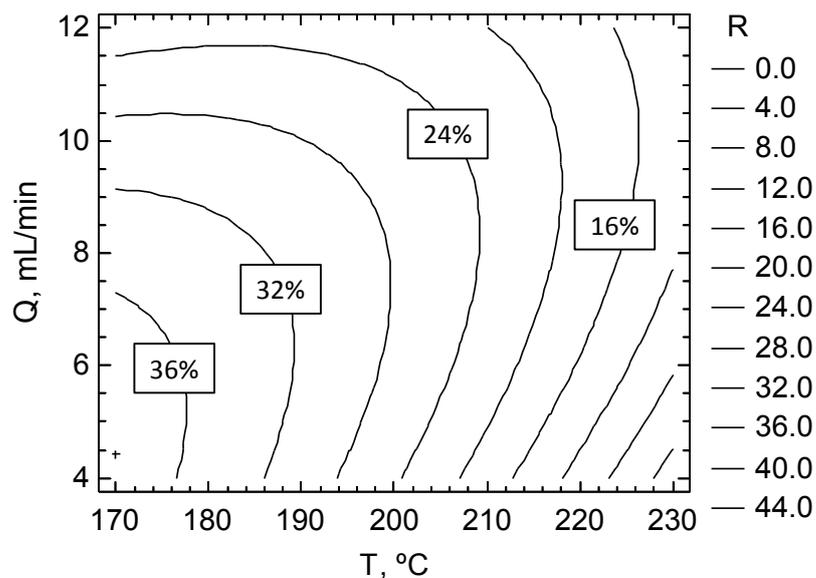


Figure 14.11. Contour plot of the yield (R).

The experimental humidity of the powders was between 4.3 y 9.1 %, which was below the value 10%, which is recommended to keep microorganisms inactivate. The quadratic model proposed was not adequate for explain the changes detected in humidity since it had a lower goodness of fit ($R^2 = 0.6547$) and the model was statistically not significant ($p > 0.05$).

The ACE inhibitory activity (IC_{50}) of dried hydrolysates varied among 234.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 304.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Because of the not significance of the model proposed ($p > 0.05$) and the goodness of fit obtained ($R^2 = 0.2789$), the variables T and Q had no effect in the ACE inhibitory activity of the hydrolysates. Outlet temperature also had no effect in the ACE inhibitory activity (Figure 14.12).

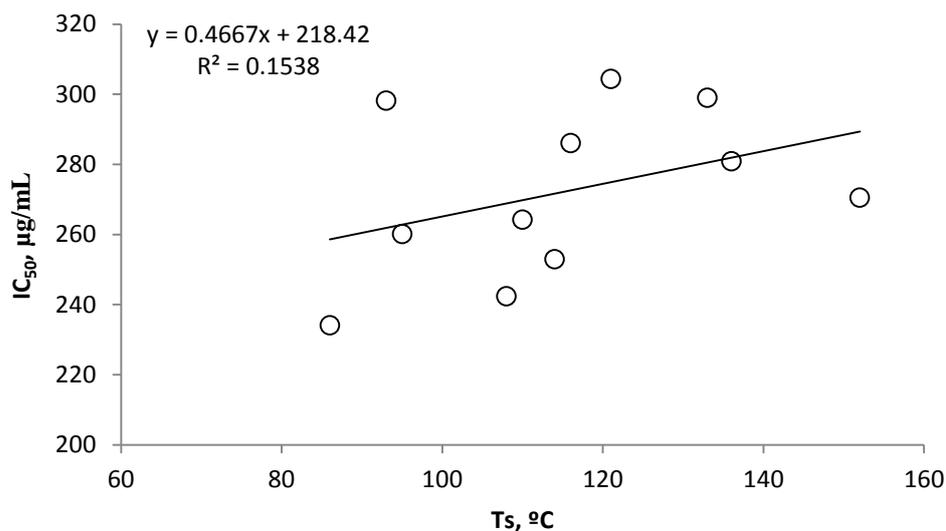


Figure 14.12. Variation of IC₅₀ values with outlet temperature (Ts).

These results were confirmed by one-way ANOVA analysis because there was no statistically significant difference ($p = 0.061$) between the inhibitory activity of the powder produced in the experiments. However a difference ($p = 0.006$) was obtained comparing the activity of the hydrolysate before and after the drying. Therefore, the drying process generated a mean decrease of 25% the ACE inhibitory activity of hydrolysates.