



CSIC



**ESTUDIO DE PEQUEÑOS PÉPTIDOS (<1500 Da) CON ACTIVIDAD
ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE GENERADOS EN EL JAMÓN CURADO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Elizabeth Escudero Fernández

Dirigida por:
Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell
Dra. M^a Concepción Aristoy Albert

Valencia, Octubre de 2012

FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACIÓN Y M^a CONCEPCIÓN ARISTOY ALBERT, DOCTORA EN FARMACIA E INVESTIGADORA TITULAR, AMBOS DEL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

HACEN CONSTAR: que el trabajo de investigación titulado “*Estudio de pequeños péptidos (<1500 Da) con actividad antihipertensiva y antioxidante generados en el jamón curado*” que presenta Dña Elizabeth Escudero Fernández por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Paterna a 25 de Octubre de 2012.

Fdo: Prof. Dr. Fidel Toldrá

Fdo: Dra. M^a Concepción Aristoy

Resumen

Durante el proceso de curado del jamón tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas entre las que destaca la intensa proteólisis de las proteínas musculares. El resultado de esta proteólisis es una acumulación de oligopéptidos y aminoácidos que contribuyen tanto directa como indirectamente al aroma, sabor y calidad final del jamón. A pesar de tener evidencia de la presencia de oligopéptidos al final del proceso de curado del jamón, se sabe muy poco sobre sus secuencias en aminoácidos y del efecto que pueden tener sobre la salud humana. En este sentido, se tiene conocimiento de que los péptidos pueden regular diferentes procesos en el organismo ejerciendo un impacto positivo en algunas funciones del cuerpo que pueden tener una importante influencia en la salud. En la última década, péptidos biológicamente activos han sido aislados de alimentos de distinta naturaleza. A estos péptidos se les ha atribuido propiedades bioactivas tales como antihipertensiva, antioxidante o antimicrobiana, entre otras. Ante la evidencia de la presencia de péptidos en el jamón curado, en esta Tesis Doctoral se investigó la presencia de actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y actividad antioxidante en fracciones peptídicas obtenidas de dicho producto. Además, se verificó *in vivo* el efecto que producían en la presión sanguínea sistólica de ratas espontáneamente hipertensas la administración de las fracciones peptídicas que poseían actividad inhibidora de la ECA. Los péptidos responsables de las actividades antihipertensiva y antioxidante, fueron aislados y secuenciados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Así, se pudieron identificar varios péptidos con actividades *in vitro* antioxidante e inhibidora de la ECA e incluso identificar un péptido con una relevante actividad antihipertensiva *in vivo*.

Resum

Durant el proces de curat del pernil tenen lloc una serie de reaccions bioquímiques entre les que destaca l'intensa proteolisis de les fibres musculars. El resultat d'esta proteolisis es una acumulació d'oligopèptids i aminoàcids que contribueixen tant directa com indirectament a l'aroma, sabor i qualitat final del pernil. A pesar de tindre evidencia de la presència d'oligopèptids al final del procés de curat del pernil, es sap molt poc sobre les seues seqüències en aminoàcids i de l'efecte que poden tindre sobre la salut humana. En este sentit, es té coneiximent de que els pèptids poden regular diferents processos en l'organisme eixercint un impacte positiu en algunes funcions del cos que poden tindre una important influència en la salut. En la darrera decada, els pèptids biològicament actius han segut aïllats d'aliments de distinta naturalesa. A aquest pèptids se'ls ha atribuït propietats bioactives tals com antihipertensiva, antioxidant o antimicrobiana, entre altres. Davant l'evidència de la presència de pèptids en el pernil curat, en la present Tesi Doctoral s'investigà la presència d'activitat inhibidora de l'enzima convertidora d'angiotensina I (ECA) i activitat antioxidant en fraccions peptídiques obtingudes de dit producte. A més, es verificà *in vivo* l'efecte que produïen en la pressió sanguínea sistòlica de rates espontàneament hipertenses l'administració de les fraccions peptídiques que posseïen activitat inhibidora de l'ECA. Els pèptids responsables de les activitats antihipertensiva i antioxidant, foren aïllats i sequenciats mitjançant cromatografia líquida acoplada a espectrometria de masses. Així, es pogueren identificar pèptids amb activitats *in vitro* antioxidant e inhibidora de l'ECA i a més, identificar un pèptid amb una important activitat antihipertensiva *in vivo*.

Abstract

During the dry-curing of ham takes place a series of biochemical reactions among which proteolysis of muscle proteins is one of the most important. The result of this proteolysis is an accumulation of amino acids and oligopeptides which directly or indirectly contribute to the aroma, flavor and final quality of the ham. Although there is evidence of the presence of oligopeptides at the end of dry-curing, little is known about their amino acid sequences and the effect of these peptides on human health. In this sense, it is known that peptides can regulate different processes in the body exerting a positive impact on some functions of the body that may have an important influence on health. In the last decade, biologically active peptides have been isolated from different types of food. These peptides have been attributed bioactive properties such as antihypertensive, antioxidant or antimicrobial activity, among others. Given the evidence of the presence of peptides in dry-cured ham, the present Thesis investigated the presence of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidant activity in peptide fractions obtained from dry-cured ham. Moreover, the effect produced in systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats after the administration of peptide fractions possessing ACE-inhibitory activity was verified *in vivo*. The peptides responsible for the detected antihypertensive and antioxidant activities, were isolated and sequenced by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Thus, several peptides with *in vitro* ACE-inhibitory and antioxidant activity were identified as well as a peptide with an important *in vivo* antihypertensive activity.

El trabajo de esta tesis es fruto de cuatro años de mi vida en los cuales he tenido la suerte de estar acompañada de gente maravillosa que me ha ayudado, me ha apoyado e iluminado con su presencia. Por ello, me gustaría expresar mi reconocimiento y mi gratitud a las siguientes personas por su extraordinaria ayuda para conseguir que llegara hasta donde estoy hoy, escribiendo estas palabras:

Al Dr. Fidel Toldrá y a la Dra. M^a Concepción Aristoy por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación y guiarme por él durante estos años. Agradeceros especialmente todo el esfuerzo y tiempo dedicado.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, por la beca FPI que ha hecho posible mi formación predoctoral, a los proyectos AGL-2007-65379-C02-01 y AGL-2010-16305 del Ministerio de Ciencia e Innovación y a los correspondientes fondos FEDER.

Al Dr. Miguel Ángel Sentandreu, gracias por prestarme tu ayuda y estar siempre ahí cuando lo he necesitado.

A los Drs. Mónica Flores y Jose Luis Navarro por estar siempre disponibles para echar una mano.

Al personal técnico del Laboratorio de Carnes, M^a Ángeles y Maribel por su ayuda y buena disposición siempre.

A M^aPilar, gracias por tu ayuda, por estar siempre preocupada por nosotras, por esas palabras de ánimo cuando las he necesitado, por tu cariño y por ser como eres.

A mis compañeras y amigas con las que empecé en el laboratorio, Aleida, Alicia, Susana, Patricia, Mónica y con las que termino, Marta, Sara, Liliana y Rosa. Ha sido todo un placer compartir con vosotras estos años tan intensos y cargados de risas, inquietudes, fiestecillas y alguna que otra lágrima. Habéis sido muy importantes ya que este trabajo va más allá de unas simples horas al día y requiere una implicación en muchas ocasiones emocional.

A Leticia, gracias por tu ayuda y por ser mi amiga. Por tus consejos, por escucharme en los momentos difíciles. Me siento muy afortunada por haberte conocido y haber tenido el placer de trabajar y colaborar contigo.

A los estudiantes de prácticas o proyectos final de carrera que han formado parte del laboratorio por un periodo corto pero suficiente para dejar huella.

A mis compañeras del Máster y del IATA, Marta, Ali y Carla por hacerme más llevaderas las clases y el interminable trayecto de tranvía al Politécnico y por esos buenos momentos que seguimos compartiendo de vez en cuando.

Al IATA, por poner los medios para la realización de mi Tesis, y en especial al personal y compañeros de otros laboratorios que he conocido estos años: Lorena, Arancha, Álvaro y Juanan. Gracias por vuestra amistad y apoyo siempre.

Al Dr. Keizo Arihara, por brindarme la posibilidad de hacer una estancia en su laboratorio y aprender a realizar ensayos *in vivo*. Su hospitalidad, dedicación y ayuda estarán en mi corazón y mi memoria para siempre.

A la Dra. Motoko Ohata, por ser mi amiga en la distancia, por haberse preocupado por mí durante mi estancia en Japón, por ser tan buena persona y tan "*kawaii*".

A los estudiantes del "Laboratory of Food Function and Safety" de la Kitasato University, por su ayuda y entrañable compañía durante mi estancia allí.

A mis padres y mi hermano, porque principalmente a vosotros os debo lo que soy y donde estoy.

En general, a mi familia, abuelos, tíos, por vuestro cariño y apoyo incondicional.

A Juan, por estar a mi lado en esta última parte del viaje, queriéndome y cuidándome.

Para terminar, dar las gracias por todos estos años tan intensos en lo profesional y personal. Y aunque escribir estas líneas me pone nostálgica y sensible, quiero acabar feliz porque estoy segura de que el futuro estará lleno de cosas buenas.

Elizabeth

ÍNDICE

I. Introducción.....	3
1. Jamón curado y proceso de elaboración.....	3
1.1 Principales cambios bioquímicos durante el proceso de elaboración del jamón.....	5
1.1.1 Reacciones enzimáticas.....	5
1.1.1.1 Glucolisis.....	5
1.1.1.2 Transformación de nucleótidos y nucleósidos.....	6
1.1.1.3 Lipólisis.....	8
1.1.1.4 Degradación y oxidación de lípidos.....	8
1.1.1.5 Reacción de Maillard.....	9
1.1.1.6 Reacción de Strecker.....	10
1.1.1.7 Proteolisis.....	10
1.1.1.7.1 Péptidos generados durante la proteolisis.....	13
2. Péptidos bioactivos.....	14
2.1 Generación de péptidos bioactivos de las proteínas de la carne.....	15
2.1.1 Proteolisis gastrointestinal.....	15
2.1.2 Maduración de la carne.....	16
2.1.3 Fermentación y curado de carnes.....	16
2.1.4 Tratamiento con proteasas.....	17
2.2 Péptidos antihipertensivos.....	18
2.2.1 Mecanismo de inhibición de la ECA.....	20
2.2.2 Absorción de péptidos inhibidores de la ECA.....	22
2.2.3 Estructura de los péptidos inhibidores de la ECA.....	23
2.2.4 Péptidos antihipertensivos de origen animal.....	24

2.2.4.1 Péptidos originados de la miosina.....	24
2.2.4.2 Péptidos originados de la troponina y derivados.....	25
2.2.4.3 Péptidos originados del colágeno.....	25
2.3 Péptidos antioxidantes.....	26
2.3.1 Péptidos antioxidantes de proteínas de alimentos.....	28
2.3.1.1 Péptidos antioxidantes procedentes de la carne.....	29
2.3.2 Mecanismo de actuación de los péptidos antioxidantes.....	30
2.3.3 Efecto en la salud de los péptidos antioxidantes.....	33
2.4 Biodisponibilidad de péptidos bioactivos.....	34
3. Métodos analíticos para la separación, purificación e identificación de péptidos bioactivos de la carne y/o productos cárnicos.....	37
3.1 Extracción de péptidos en carne y productos cárnicos.....	38
3.2 Técnicas de separación.....	39
3.2.1 Ultrafiltración.....	39
3.2.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	39
3.2.3 Electroforesis en gel.....	40
3.2.4 Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC).....	41
3.2.5 Cromatografía de intercambio iónico (CII).....	42
3.2.6 Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC).....	43
3.3 Identificación y secuenciación.....	44
3.3.1 Secuenciación de Edman.....	45
3.3.2 Identificación por espectrometría de masas.....	45
3.3.2.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	48
3.3.2.2 Espectrometría de masas en tandem.....	49
3.3.2.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	50

4. Evaluación de la capacidad antihipertensiva y medida de la actividad antioxidante de péptidos.....	52
4.1 Capacidad antihipertensiva.....	52
4.1.1 Estudios <i>in vitro</i>	52
4.1.2 Estudios <i>in vivo</i>	54
4.2 Estudio de la actividad antioxidante.....	56
4.2.1 Métodos <i>in vitro</i>	56
4.2.2 Métodos <i>in vivo</i>	60
4.3 Normativa legal sobre ingredientes y alimentos con efectos beneficiosos para la salud.....	60
5. Bibliografía.....	62
II. Objetivos.....	81
III. Resultados.....	87
Capítulo 1. Estudio del efecto antihipertensivo y actividad antioxidante de fracciones peptídicas extraídas del jamón curado.....	87
Capítulo 2. Purificación e identificación de péptidos antihipertensivos en jamón curado.....	113
Capítulo 3. Identificación de péptidos antioxidantes generados en jamón curado.....	139
IV. Discusión general.....	163
V. Conclusiones.....	177

I. Introducción

I. Introducción

1. Jamón curado y proceso de elaboración

En España el jamón curado constituye una categoría de producto muy aceptado por el consumidor y totalmente introducido en su dieta habitual: prácticamente consume jamón curado el 90% de la población. El jamón curado goza además, de una alta valoración alimentaria, sin duda por sus características organolépticas y nutricionales. En este sentido, el jamón curado es un importante alimento de la dieta porque representa una fuente de proteínas de alto valor biológico y además aporta vitaminas del grupo B, minerales y elementos traza biodisponibles (Jiménez-Colmenero et al., 2010). En la **Tabla 1** se puede apreciar un ejemplo de la composición nutricional del jamón curado. Los valores son aproximados ya que pueden variar dependiendo del cerdo, su alimentación, proceso de curado, etc.

Tabla 1. Valor nutricional del jamón curado

Composición nutricional del jamón curado	
Valores por 100 g de producto	
Calorías	160 kcal
Proteína	22 g
Grasa	8 g
Ac. Grasos monoinsaturados	55%
Ac. Oleico	45%
Ac. Palmitoleico	10%
Ac. Grasos saturados	40%
Ac. Grasos poliinsaturados	5%
Contenido en Na	2.3 mg
Vitaminas	
B1	0.57 mg
B2	0.25 mg
B3	6.7 mg
B6	0.41 mg
E	0.08 mg
Minerales	
Ca	12.7 mg
P	223 mg
Mg	17.10 mg
Fe	2.3 mg
Zn	2.20 mg
Na	2.34 mg
K	250 mg
I	11.4 mg

En España la elaboración del jamón curado se realiza sometiendo a los perniles del cerdo a un corto proceso de salazón (10-14 días) al que le sigue un lento periodo de secado y maduración, en ningún caso inferior a 7 meses, que puede durar incluso años. A diferencia de los países del norte y centro Europa, el jamón español, salvo pequeñísimas excepciones, no es ahumado. El proceso de elaboración del jamón curado español puede verse esquematizado en la **Figura 1** :

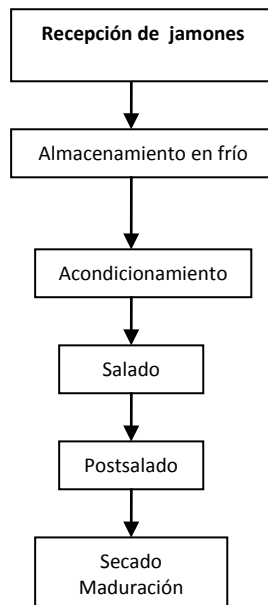


Figura 1. Principales etapas en la elaboración del jamón curado.

Durante el proceso de elaboración del jamón curado, las etapas de secado y maduración son de gran importancia ya que permitirán la obtención de un producto que podrá conservarse a temperatura ambiente sin riesgo para la salud del consumidor, ni de posibles alteraciones. En esta fase del proceso se persigue la total estabilización del producto mediante la disminución de la actividad de agua,

por la acción conjunta de las sales de curado adicionadas en la etapa de salado y la posterior desecación (Nieto, 1988; Sayas & Pérez, 1989; Astiasaran et al., 1991; Palmia et al., 1991; Flores et al., 1984). Consecuencia de un correcto proceso de maduración-dsecación es el desarrollo de propiedades sensoriales características, derivadas de los procesos enzimáticos, lipolíticos y proteolíticos que liberan productos de bajo peso molecular como aminoácidos, oligopéptidos, ácidos grasos y compuestos carbonílicos, que darán al producto el aroma y sabor característicos (Mora et al., 2009; Sentandreu et al., 2003; Sforza et al., 2001; Toldrá et al., 1997 y 1998) y que son detallados a continuación.

1.1 Principales cambios bioquímicos durante el proceso de elaboración del jamón

Durante el proceso de elaboración del jamón curado se suceden una serie de cambios bioquímicos como consecuencia de diversas reacciones enzimáticas. Dentro de las principales reacciones enzimáticas se encuentran la proteólisis (que afecta a las proteínas musculares), lipólisis (que afecta a los triglicéridos y fosfolípidos) y, menos importante, la glucólisis y la transformación de nucleótidos. Por otro lado, también tienen lugar reacciones de tipo químico como son las reacciones de Maillard, las degradaciones de Strecker o las oxidaciones. Todas las reacciones ocurren de forma simultánea con mayor o menor intensidad en función de las características y el momento del proceso y todas ellas contribuirán al desarrollo del sabor y aroma final del producto.

1.1.1 Reacciones enzimáticas

1.1.1.1 Glucólisis

La glucólisis o glicolisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Consiste en 11 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es

capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo.

En los organismos aerobios, la glucólisis sirve de preámbulo al ciclo del ácido cítrico y a la cadena de transporte electrónico, los cuales recolectan la mayor parte de la energía de la glucosa. En estas condiciones, el piruvato es oxidado hasta CO_2 y agua mediante reacciones acopladas, generando 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En el momento del sacrificio del animal, el mayor cambio que experimenta el músculo tiene que ver con esa síntesis energética. El aporte de oxígeno derivado de la circulación sanguínea al tejido muscular se interrumpe, la respiración celular se paraliza y surge la síntesis anaerobia de energía con un rendimiento mucho menor en la generación de ATP. El músculo anaerobio no puede mantener su nivel normal de ATP y la glucólisis *postmortem* provoca la reducción de ácido pirúvico a ácido láctico en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa, con la consecuente disminución de pH en el músculo. En esta vía se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. El descenso de pH hace que las proteínas miofibrilares se aproximen a sus puntos isoeléctricos y se desnaturalicen. La desnaturalización va acompañada de una reducida capacidad de retención de agua de las proteínas (CRA), fenómenos causantes de la exudación y por ende de la aparición de las diversas calidades de carne. Así, una rápida acidificación causada por un metabolismo muscular acelerado en cerdos susceptible a estrés, daría lugar a carnes PSE, mientras que una ausencia de azúcares/glucógeno mantendría el pH cercano a la neutralidad, dando lugar a carnes DFD.

1.1.1.2 Transformación de nucleótidos y nucleósidos

Los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa) , una base nitrogenada

(purina o pirimidina) y uno, dos o tres grupos fosfato. El nucleósido es la parte del nucleótido formado únicamente por la base nitrogenada y la pentosa mediante enlace N-glucosídico. El adenosín trifosfato (ATP) es el nucleótido mayoritario en músculo vivo y está formado por la unión de una base nitrogenada de adenina con una ribosa y tres fosfatos. Es la principal fuente de energía del músculo y es utilizada en una gran variedad de reacciones metabólicas. Tras el sacrificio del animal, la concentración de ATP disminuye rápidamente, siendo la causa principal de la instauración del *rigor mortis* en la carne (Greaser, 1986). Así, inmediatamente después del sacrificio del animal y una vez se agotan las reservas de fosfocreatina y glucógeno, la concentración de ATP disminuye en pocas horas, pasando a formarse, adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP) mediante hidrólisis enzimática. Posteriormente el AMP es desaminado enzimáticamente a IMP (inosín 5' monofosfato), el cual, a su vez se descompone en inosina (INO) y, finalmente en hipoxantina (Hx) (Burns & Ke, 1985). En una etapa posterior de degradación, la Hx podría oxidarse a xantina (X) y ácido úrico (AU) en un proceso lento en el que estarían implicadas enzimas autolíticas y posiblemente microbianas (Surette et al., 1988). La **Figura 2** muestra las enzimas responsables de cada etapa. También se forman por acción enzimática, pero en menor cantidad, guanosín monofosfato (GMP), que a su vez puede degradarse en guanosina y guanina, citidín monofosfato (CMP) y uridín monofosfato (UMP).

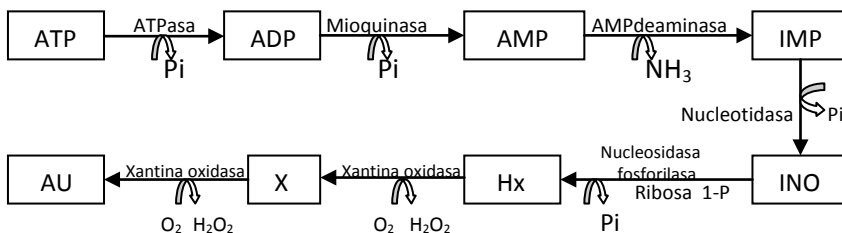


Figura 2. Esquema de la degradación del ATP

1.1.1.3 Lipólisis

La lipólisis constituye uno de los grupos de reacciones bioquímicas más importantes en la generación del flavor y /o precursores del flavor que tienen lugar durante la elaboración del jamón curado. La lipólisis consiste en la hidrólisis enzimática de los lípidos musculares y del tejido adiposo. Afecta principalmente a los triglicéridos, generando di y monoglicéridos y liberando gran cantidad de ácidos grasos libres (Motilva et al., 1993) pero también a los fosfolípidos, más abundantes en la grasa intramuscular liberando, así mismo, ácidos grasos. En la **Figura 3** se puede apreciar el esquema general de la lipólisis que tiene lugar durante el procesado del jamón curado:

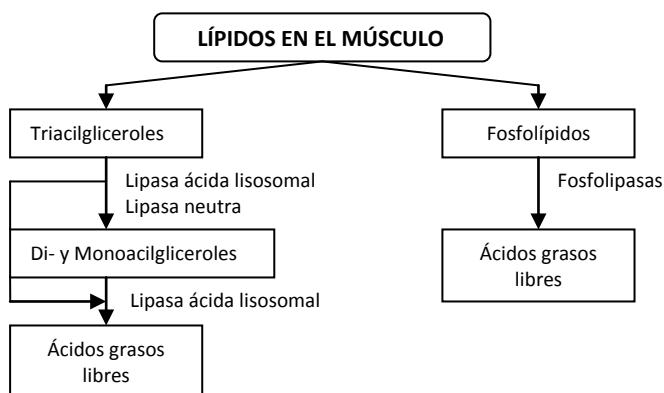


Figura 3. Esquema general mostrando las principales etapas en la lipólisis del músculo durante el procesado del jamón curado.

Estos ácidos grasos liberados van a servir de sustratos para posteriores reacciones oxidativas que en último lugar darán origen a una serie de compuestos aromáticos muy importantes para el desarrollo del flavor característico del jamón curado.

1.1.1.4 Degradación y oxidación de lípidos

La degradación de lípidos se inicia con la hidrólisis enzimática, descrita anteriormente, en la que se generan ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos

libres son susceptibles de ser oxidados. Dicha oxidación se inicia con la formación de radicales libres por la acción de diferentes catalizadores como son la luz, oxígeno, iones metálicos, temperatura elevada, humedad o enzimas como la lipoxigenasa o ciclooxigenasa, dando lugar a la formación de hidroperóxidos. Estos hidroperóxidos son muy inestables y reactivos y aunque no tienen olor y, por lo tanto, no se van a apreciar en el alimento, van a ser el origen de productos secundarios de oxidación (cetonas, alcoholes, aldehídos, hidrocarburos y ácidos). Algunos de ellos presentan bajos umbrales de percepción y por lo tanto tienen un gran impacto sobre el aroma (Shahidi et al., 1986). Los hidroperóxidos también pueden reaccionar con proteínas, péptidos o aminoácidos y polimerizarse (Buscailhon et al., 1993).

1.1.1.5 Reacción de Maillard

La reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático es una de las principales rutas de generación de compuestos responsables del aroma de la carne y productos cárnicos. Esta reacción se produce cuando los grupos amino libres de compuestos proteicos tales como proteínas, péptidos o aminoácidos, se combinan con los grupos carbonilo de los azúcares para formar glucosilaminas. Las reacciones de Maillard requieren de un aporte de calor o almacenamientos prolongados a temperatura ambiente, aunque es a elevadas temperaturas cuando la reacción tiene lugar más rápidamente y es responsable del color, aroma y sabor en muchos alimentos.

El conjunto de reacciones de oxidación y de Maillard dan lugar a un gran número de compuestos volátiles tales como carbonilos (aldehídos y cetonas), furanos, ácidos grasos, pirazinas, y compuestos azufrados (sulfuros, tiazoles, tioles y tiofenos) que contribuyen a la formación de compuestos aromáticos en muchos alimentos (García et al., 1991; Flores et al., 1997). La importancia de estas

reacciones durante el curado dependerá de las condiciones del proceso (Ventanas et al., 1992).

1.1.1.6 Reacciones de Strecker

Las reacciones de Strecker constituyen otra ruta de formación de compuesto volátiles y forma parte del mecanismo de pardeamiento no enzimático (Cremer y Eichner, 2000), involucrando la desaminación oxidativa y la descarboxilación de amino ácidos en presencia de compuesto alfa-dicarbonilos para producir aminocetonas, aldehídos y dióxido de carbono. Los compuestos generados poseen características aromáticas intensas y pueden contribuir al desarrollo del aroma final característico del jamón curado.

1.1.1.7 Proteolisis

La proteolisis constituye uno de los grupos más importantes de reacciones bioquímicas en la generación del sabor y de compuestos precursores del aroma durante el proceso de elaboración de jamón curado. Engloba a una serie de reacciones enzimáticas en cadena tal como se define a continuación (ver también

Figura 4):

(1) se produce una proteolisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas por acción de las calpainas y catepsinas dando lugar a la formación de polipéptidos de tamaño intermedio, (2) consecuentemente, se degradan a pequeños péptidos por la acción de las peptidasas y (3) se generan finalmente péptidos muy pequeños y amino ácidos libres como resultado de la acción de di- y tri- peptidilpeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

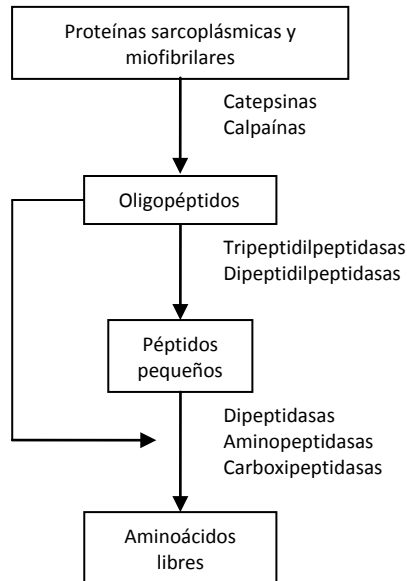


Figura 4. Esquema general que muestra las principales etapas de la proteólisis durante el procesado del jamón curado.

Las principales endopeptidasas musculares son la u-calpaína, m-calpaína las catepsinas B, H, L y D y proteasoma. Las calpaínas están activas tan solo en las primeras semanas (fase de post-salado) mientras que las catepsinas (B, H, y L) son muy estables y se mantienen hasta 15 meses a lo largo del todo el proceso (Toldrá et al., 1993). La catepsina D es inhibida en gran medida por el NaCl durante la maduración, en cambio las catepsinas B y L a priori están menos inhibidas por la sal, encontrándose actividades del 70-80% de la actividad inicial a concentraciones de entre 4-5% de NaCl (Rico et al., 1991). El proteasoma actúa a pH ligeramente alcalinos, aunque su estabilidad durante el procesado del jamón se desconoce. Así, la acción conjunta de calpaínas y catepsinas sobre las principales proteínas constituyentes del músculo producen la rotura de éstas que se traducirá en un

aumento de la ternura de la carne y la generación de nuevos péptidos (Sentandreu et al., 2002; Lametsch et al., 2003; Nagaraj et al., 2005). Estos péptidos derivados de la acción de las endopeptidasas son degradados posteriormente por la acción de las exopeptidasas, que hidrolizan la cadena peptídica a partir de sus extremos. Estas enzimas están implicadas en las últimas etapas de la degradación proteolítica y de entre los principales grupos de exopeptidasas se encuentran:

- Las peptidasas, que pueden ser responsables de la generación de di- y tripeptidos según se trate de dipeptidilpeptidasas o tripeptidilpeptidasas, respectivamente. Actúan generando di- o tripéptidos desde el extremo amino terminal, respectivamente.
- Las aminopeptidasas, que son capaces de generar amino ácidos libres desde el extremo amino terminal de proteínas y péptidos.
- Las carboxipeptidasas, que actúan a partir del extremo carboxi terminal, siendo también responsables de la generación de amino ácidos libres.
- Otras enzimas comunes pero menos estudiadas en carne y productos cárnicos son las peptidildipeptidasas, que hidrolizan dipéptidos a partir del extremo carboxi terminal de polipéptidos, las dipeptidasas que actúan sobre dipéptidos, y las tripeptidasas, que lo hacen sobre el extremo amino o carboxi terminal de tripéptidos.

La mayor parte de los amino ácidos libres que se generan en el jamón curado son resultado de la acción de las aminopeptidasas (Toldrá et al., 1997). La actividad de las aminopeptidasas musculares (alanil, arginil, leucil, tirosil y piroglutamil aminopeptidasas) presenta gran estabilidad durante los primeros 8 meses de curado, aunque se reduce considerablemente al final del proceso debido principalmente al efecto inhibitor de la sal, la desecación y la propia actividad proteolítica (Toldrá et al., 1992). Además, estas enzimas también se ven inhibidas

por la acumulación de los amino ácidos libres al final del proceso de curado (Flores et al., 1998). La alanil aminopeptidasa es la más importante de todas y su actividad supone hasta el 86% del total de actividad aminopeptidasa. Además de su preferencia por la alanina, también actúa de manera específica sobre sustratos con enlaces aromáticos, alifáticos y aminoácil básicos (Flores et al., 1996). Así pues, se puede considerar que esta aminopeptidasa es la más importante en la generación de aminoácidos libres durante el proceso de jamón curado.

Los amino ácidos libres y oligopéptidos generados durante esta intensa proteólisis son responsables en gran medida, junto con otros compuestos volátiles, del característico flavor del jamón curado.

1.1.1.7.1 Péptidos generados durante la proteólisis

Los péptidos que se encuentran en la carne se han relacionado generalmente con la proteólisis *post-mortem*, que es la responsable del desarrollo de la ternura y de las características organolépticas propias del producto y, por tanto, de la calidad final del mismo.

En los productos cárnicos se produce una intensa hidrólisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas durante su procesado. Sin embargo, a pesar de haberse documentado la presencia de fragmentos generados durante todo el proceso de elaboración (Rodríguez- Nuñez et al., 1995; Hansen- Möller et al., 1997; Martín et al., 2001; Sentandreu et al., 2003), es en los últimos años cuando se está avanzando en la identificación de los péptidos generados. Así, la intensa proteólisis que tiene lugar durante el curado del jamón se traduce en la generación de una gran cantidad de péptidos de pequeño tamaño (menor de 4.5 kDa). Por otro lado, di y tripéptidos generados por acción de las dipeptidil y tripeptidilpeptidasas han sido aislados del jamón curado y secuenciados (Sentandreu et al., 2003). Algunos de estos péptidos

contribuirían al flavor característico del jamón, en función de su composición en amino ácidos.

Además, secuencias completas de oligopéptidos procedentes de proteínas tales como la actina, miosina, titina, troponina o creatín quinasa (Sentandreu et al., 2007; Mora et al., 2009 y 2010) han sido recientemente identificadas en el jamón curado.

La presencia de péptidos en la carne y productos cárnicos se ha relacionado generalmente con la calidad de los mismos por lo que la identificación de péptidos generados durante el curado del jamón aportaría información sobre el procesado del jamón y las reacciones bioquímicas que ocurren durante el curado. Además, en los últimos años se viene reconociendo el papel protector o beneficioso de algunos péptidos presentes en alimentos sobre la salud del consumidor, por lo que estudios en profundidad permitirían conocer propiedades funcionales y/o bioactivas de estos péptidos y como influirían en nuestro organismo.

2. Péptidos bioactivos

Las proteínas de los alimentos han sido apreciadas desde siempre por sus propiedades nutricionales y funcionales. Tradicionalmente, las propiedades nutricionales de las proteínas se asocian al contenido en aminoácidos, especialmente los esenciales. Sin embargo, recientemente se está investigando la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de las proteínas de los alimentos, con vistas a conocer mejor las propiedades nutricionales de dichos alimentos y también a utilizar dichos péptidos como ingredientes funcionales (Vercruyse et al., 2005)

Los péptidos bioactivos han sido definidos como " compuestos derivados de los alimentos (genuinos o generados) que, además de su valor nutricional ejercen un

efecto fisiológico en el organismo" (Vermeirssen et al., 2007). Dentro de la secuencia de la proteína original los péptidos se encuentran inactivos y deben ser liberados para convertirse en activos. Esto sucede durante el procesado del alimento y/o durante la digestión gastrointestinal, mediante hidrólisis enzimática. Los péptidos bioactivos tienen normalmente entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, aunque se han descrito también péptidos bioactivos de más de 20 residuos. Sus actividades dependen de su composición en aminoácidos y secuencia (Korhonen & Pihlanto, 2003).

Estos péptidos deben ser absorbidos intactos a través del intestino donde posteriormente entrarán en el sistema circulatorio para ejercer su efecto fisiológico, o puede ser también que su efecto sea local en el tracto digestivo (Erdman et al., 2008).

Dependiendo de la secuencia en aminoácidos, los péptidos bioactivos han demostrado tener un amplio número de funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la antihipertensiva, antioxidante, opiáceo-antagonista, inmunomoduladora, antimicrobiana, prebiótica, antitrombótica e hipocolesterolémica, entre otras (Arihara, 2006).

La carne ofrece una fuente muy valiosa de proteínas para la población y además ofrece un gran potencial como fuente de péptidos bioactivos.

2.1 Generación de péptidos bioactivos de las proteínas de la carne.

2.1.1 Proteólisis gastrointestinal

Los péptidos bioactivos pueden ser generados a partir de las proteínas de la carne durante la digestión gastrointestinal. Las proteínas ingeridas son atacadas por varios enzimas digestivos, tales como la pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasas (Pihlanto y Korhonen, 2003). Estas enzimas digestivas pueden generar péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de

angiotensina I (ECA) en el tracto gastrointestinal (Arihara et al., 2001; Escudero et al., 2010). Muchos de los péptidos generados pueden provenir de las proteínas miosina, actina, tropomiosina y troponina tras el tratamiento con proteasa pancreática (Katayama et al., 2003). En otros casos, los péptidos bioactivos son generados en el propio alimento tal y como se indica a continuación.

2.1.2 Maduración de la carne

Tras el sacrificio del animal, el músculo esquelético se convierte en carne vía maduración. Durante la maduración o almacenado, las proteínas de la carne son hidrolizadas por proteasas endógenas del músculo, tales como las calpaínas y catepsinas, mencionadas en apartados anteriores con la consiguiente generación de péptidos de diversos tamaños. Así, Nishimura et al. (1988) ya observó cambios en los niveles de oligopéptidos durante el almacenado en frío de carnes de vacuno, cerdo y pollo, como por ejemplo, el contenido de péptidos en cerdo aumentó de 2.40 mg/g de carne el día uno a 3.05 mg/g de carne el día seis de maduración.

Se sabe que la hidrólisis enzimática de las proteínas de la carne durante la maduración o almacenaje contribuye a la mejora de las propiedades sensoriales de la carne, tales como la textura, el sabor, y el aroma (Nishimura et al., 1988). Sin embargo, no hay estudios sobre la generación de péptidos bioactivos en la carne durante la maduración post-mortem.

2.1.3 Fermentación y curado de carnes

Los compuestos generados a partir de las proteínas de la carne mediante las reacciones proteolíticas que tienen lugar durante la fermentación de algunos productos cárnicos, tales como el salchichón y el jamón curado, son importantes para el desarrollo de las características sensoriales de dichos productos (Hammes et al., 2003; Toldrá, 2004). En la elaboración del jamón curado las proteínas de la

carne empleada como materia prima son principalmente degradadas a péptidos por enzimas endógenos (catepsinas B, D, H, y L).

Existen muy pocos estudios sobre la generación de péptidos bioactivos en las proteínas de la carne de productos cárnicos fermentados, aunque se han estudiado actividades antioxidantes e inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina I en algunos extractos de productos fermentados y/o madurados (salchichón y jamón curado). En dichos estudios se encontró que los niveles de actividad biológica en los extractos del producto procesado fueron más elevados que los de aquellos extractos del producto no fermentado o no madurado (Broncano, et al., 2011; Arihara y Ohata, 2008). Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad el origen de dicha actividad. Por otro lado, se identificaron péptidos pequeños en el jamón curado (Sentandreu et al., 2003) y más tarde fue sugerido que la acción proteolítica de las enzimas musculares del cerdo, como las dipeptidilpeptidasas, contribuían a la generación de péptidos inhibidores de la ECA (Sentandreu y Toldrá 2007).

2.1.4 Tratamiento con proteasas

Proteasas procedentes de animales, plantas y de origen bacteriano han sido utilizadas por la industria alimentaria en el procesamiento de determinados alimentos, como por ejemplo en la tenderización de la carne (Dransfield y Etherington, 1981). Los enzimas más comúnmente utilizados por la industria cárnica son de origen vegetal (papaína, bromelaína y la ficina). En carne sometida a tenderización enzimática se pueden generar péptidos con actividades biológicas y de hecho muchos péptidos bioactivos han sido generados de manera experimental mediante el uso de proteasas comerciales (Korhonen y Pihlanto, 2003; Pihlanto y Korhonen, 2003). También ha sido investigado el efecto de proteasas comerciales

en la rotura de proteínas y en las características sensoriales de salchichones curados y fermentados (Bruna et al., 2000).

2.2 Péptidos antihipertensivos

Los péptidos inhibidores de la ECA fueron descubiertos por primera vez en el veneno de serpiente (Ferreira et al., 1970) y desde entonces se han desarrollado numerosos inhibidores sintéticos de la enzima, siendo el Captopril el primero y más conocido. Este inhibidor junto con otros inhibidores sintéticos de la ECA presentan varios efectos secundarios tales como tos, defectos en el gusto y erupciones cutáneas (Quian et al., 2007; Vermeirssen et al., 2002). Estos efectos secundarios, junto con el hecho de que la hipertensión afecta a un tercio de la población mundial occidental y que es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y la aparición de infarto cardiaco, han contribuido al esfuerzo por buscar péptidos con actividad inhibidora de la ECA, derivados de proteínas de alimentos para su empleo como agentes antihipertensivos en alimentos funcionales y nutraceúticos (Lopez-Fandino et al., 2006). Los péptidos inhibidores de la ECA son el grupo más estudiado de péptidos bioactivos originados a partir de proteínas de alimentos (Vercruysse et al., 2005). La **Tabla 2** presenta algunos ejemplos de estos péptidos con su valor IC_{50} (concentración de inhibidor/péptido que ejerce el 50% de inhibición) y en algunos casos los valores de bajada de presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas tras la administración oral de los péptidos.

Tabla 2. Péptidos inhibidores de la ECA derivados de la carne de animales domésticos.

Origen	Péptido	Proteína	Enzima	IC ₅₀ (μM)	REH ^a
cerdo	ITTNP	miosina	termolisina	549	21.0 mmHg ^e
	MNPPK	miosina	síntesis	945.5	23.4mmHg ^e
	MNP	miosina	síntesis	66.6	19.6mmHg ^e
	PPL	miosina	síntesis	>1000	24.7mmHg ^e
	NPP	miosina	síntesis	290.5	17.6mmHg ^e
	TNP	miosina	síntesis	207.4	11.1mmHg ^e
	VKKVLGNP	miosina	pepsina	28.5	24.0mmHg ^{b,f}
	KRVITY	miosina	pepsina	6.1	23.0mmHg ^{b,g}
	VKAGF	actina	pepsina	20.3	17.0mmHg ^{b,g}
	KRQKYDI	troponina T	pepsina	26.2	9.9mmHg ^{b,h}
	KAPVA	titina	pepsina+pancreatina	46.56	33.7mmHg, ⁱ
	PTPVP	titina	pepsina+pancreatina	256.41	25.6mmHg, ⁱ
	RPR	músculo	pepsina+pancreatina	382	33.2mmHg, ⁱ
	pollo	LKP	aldolasa	termolisina	0.32
LAP		músculo	termolisina	3.2	40.0 mmHg ^{c,j}
FKGRYYP		creatina quinasa	termolisina	0.55	0 mmHg ^{c,j}
IKW		músculo	termolisina	0.21	50.0 mmHg ^{c,j}
GFXGTXLXGF		músculo	proteasa <i>Aspergillus</i> + proteasas gástricas	42.4	20 mmHg ^{d,k}
ternera	VLAQYK	músculo	Termolisina+proteinasas A	32.06	nt ^l
	GFHI	músculo	proteinasas K	64.3	nt ^m
	DFHING	músculo	alcalasa	50.5	nt ^m
	FHG	músculo	Termolisina+proteinasas A	52.9	nt ^m
	GLSDGEWQ	músculo	Termolisina+proteinasas A	117	nt ^m
	GPV	gelatina de la piel	alcalasa+pronasaE+colagenasa	4.67	nt ⁿ
	GPL	gelatina de la piel	alcalasa+pronasaE+colagenasa	2.55	nt ⁿ

^aMáxima bajada en la presión sistólica de ratas espontáneamente hipertensas tras la administración oral de 1mg de péptido/kg. ^bMáxima bajada en la presión sistólica de ratas espontáneamente hipertensas tras la administración oral de 10mg de péptido/kg. ^cMáxima bajada en la presión sistólica de ratas espontáneamente hipertensas tras la administración intravenosa de 10mg de péptido/ kg. ^dMáxima bajada en la presión sistólica de ratas espontáneamente hipertensas tras la administración intravenosa de 30mg de péptido/ kg.; n.t: no testado en ratas. ^eArihara et al. 2001; Nakashima et al., 2002. ^fKatayama et al. 2007. ^gMuguruma et al. 2009. ^hKatayama et al. 2008. ⁱEscudero et al. 2010 y 2012. ^jIroyukifujita et al. 2000. ^kSaiga et al. 2006 y 2003. ^lJang y Lee, 2005, Jang et al. 2004. ^mJang et al. 2008. ⁿKim et al. 2001.

2.2.1 Mecanismo de inhibición de la ECA

La enzima convertidora de angiotensina-I (ECA; dipeptidil carboxipeptidasa; EC 3.4.15.1) es una enzima clave en la regulación de la presión arterial periférica. La ECA se ha asociado clásicamente con el sistema renina-angiotensina, el cual convierte la angiotensina-I en un potente vasoconstrictor, la angiotensina II. En el sistema kinin-kallikrein la ECA también degrada el vasodilatador bradiquinina y estimula la liberación de aldosterona en la corteza adrenal (Ondetti, et al., 1977). La angiotensina-II es un potente vasoconstrictor y estimula la producción de aldosterona (hormona mineralocorticoide producida por la zona glomerular de la corteza suprarrenal) que a su vez activa la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales (a nivel del tubo colector), que son devueltos a la sangre. La retención de sodio y de agua produce un incremento de volumen sanguíneo que tiene como resultado un aumento de la tensión arterial (Brown y Vaughan, 1998; Folkow et al., 1961). La **Figura 5** muestra el sistema renina-angiotensina:

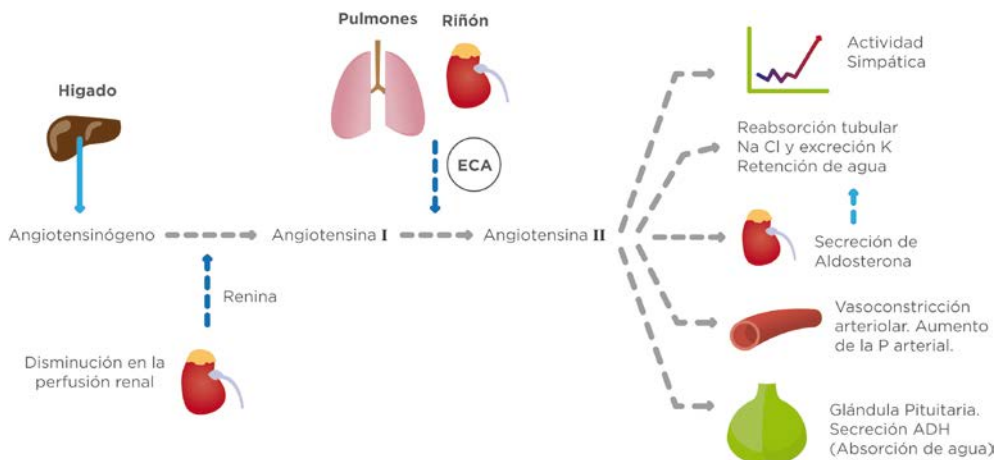


Figura 5. Sistema renino-angiotensina.

La ECA es una exopeptidasa que libera dipéptidos desde el extremo c-terminal de varios sustratos de péptidos. La correlación estructura-actividad de diferentes péptidos inhibidores indica que la unión de estos a la ECA está fuertemente influenciado por el extremo C-terminal de la secuencia del sustrato. Aunque esta especificidad de sustrato aún no es claramente conocida, la ECA parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en cada una de las tres posiciones cercanas al C-terminal.

Un factor importante al discutir sobre los péptidos inhibidores de la ECA aislados de proteínas de alimentos es la discrepancia entre la actividad inhibidora de los péptidos *in vitro* y su efecto antihipertensivo *in vivo* (Vercruyssen et al., 2005; Arihara y Ohata, 2006).

Los péptidos inhibidores de la ECA provenientes de alimentos pueden ser divididos en tres categorías dependiendo de su actividad inhibidora tras la pre-incubación o contacto previo con la ECA (Iroyukifujita et al., 2000). El primer grupo de péptidos inhibidores de la ECA son conocidos como "verdaderos inhibidores". El valor IC_{50} de estos péptidos no depende de su pre-incubación con la enzima. La segunda categoría de péptidos, conocida como péptidos de "tipo sustrato", son hidrolizados por la ECA resultando en una débil actividad inhibidora. Finalmente, la tercera categoría son los inhibidores "tipo pro-fármaco" ya que son convertidos en "verdaderos inhibidores" por la pre-incubación con la ECA o con proteasas del tracto digestivo. Estudios *in vivo* han demostrado que solo los péptidos pertenecientes al grupo de verdaderos inhibidores o pro-fármaco reducen la presión sanguínea sistólica de ratas espontáneamente hipertensivas (Arihara y Ohata, 2006).

Hasta la fecha, la mayoría de péptidos inhibidores de la ECA encontrados en carne pueden ser clasificados como verdaderos inhibidores (Jang et al., 2008; Katayama et al., 2004). Estos péptidos actuarían de dos maneras: primero, el péptido se

uniría al sitio activo de la enzima o segundo, el péptido se uniría al lugar de inhibición de la ECA modificando la conformación de la proteína y previniendo al sustrato (angiotensina-I) de que se una al sitio activo (Wijesekara y Kim, 2010)

2.2.2 Absorción de péptidos inhibidores de la ECA.

Para que un péptido inhibidor de la ECA funcione *in vivo*, debe primeramente entrar intacto en el sistema circulatorio. Los péptidos pueden ser hidrolizados por enzimas del tracto digestivo así como también por peptidasas asociadas con la membrana de las vellosidades del intestino, el citoplasma o suero (Foltz et al., 2008; Sun et al., 2009). Hasta la fecha, hay estudios documentando la absorción intestinal *in vitro* de péptidos inhibidores de la ECA empleando las células Caco-2 (Vermeirssen et al., 2004). Este modelo es generalmente reconocido como apropiado para predecir la permeabilidad de las células del epitelio intestinal a fármacos (Cinq-Mars et al., 2007; Bailey, 1996).

Curiosamente, la ocurrencia de péptidos que demuestran actividad inhibidora de la ECA *in vitro* pero pobre actividad antihipertensiva *in vivo* puede ser explicada por la posible alteración de péptidos antes de alcanzar la diana de la enzima en el sistema circulatorio (Cinq-Mars et al., 2007; Fujita et al., 1995). Lo contrario también ha sido demostrado como verdadero, con péptidos que mostraron poca actividad inhibidora de la ECA *in vitro* y demostraron un significativo descenso de la presión sanguínea sistólica *in vivo*, posiblemente debido a una modificación del péptido en el intestino.

Los péptidos inhibidores de la ECA y derivados de la leche como son Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro han sido sometidos a estudios de permeabilidad (Foltz et al., 2008). Ambos péptidos fueron rápidamente transportados a través del epitelio intestinal utilizando varios modelos. El péptido IPP evitó la digestión gastrointestinal y pudo entrar en el sistema circulatorio de los humanos de manera intacta (Foltz et al.,

2007). Estudios relacionados con la administración oral de alimentos enriquecidos con IPP y VPP demostraron que estos alimentos disminuían la presión sanguínea sistólica en pacientes hipertensos (Seppo et al., 2003; Jauhiainen et al., 2005). Lo aquí descrito demostraría que determinados péptidos inhibidores de la ECA son suficientemente bien absorbidos por el organismo para ser efectivos reduciendo la presión sanguínea de sujetos hipertensos.

El objetivo para los investigadores es identificar los péptidos bioactivos *in vitro* que pueden entrar intactos en el sistema circulatorio y llegar activos al sitio diana.

2.2.3 Estructura de los péptidos inhibidores de la ECA

Como se ha comentado anteriormente, el modo de acción de la mayoría de péptidos inhibidores de la ECA es como sustrato competitivo de la enzima. La relación estructura-actividad de estos péptidos no ha sido aún confirmada debido a la variedad de propiedades y/o secuencias de aminoácidos de los péptidos inhibidores de la enzima (Li et al., 2004; Arihara y Ohata, 2006). Se ha sugerido que el factor que controla que los péptidos sean inhibidores de la ECA son los tres aminoácidos situados en el extremo C-terminal del péptido y que normalmente deben contener residuos de amino ácidos hidrofóbicos. Se sabe que en las penúltimas posiciones, los residuos alifáticos (Val, Ile y Ala), básicos (Arg) y aromáticos (Tir, Fen) son preferidos, mientras que los residuos aromáticos (Trp, Tir, y Fen), prolina (Pro) y alifáticos (Ile, Ala, Leu y Met) favorecen la unión a la enzima cuando están situados en la última posición del extremo c-terminal del péptido (Fujita y Yoshikawa, 1999; Yokohama et al., 1992; Hayes et al., 2007). Esto es debido a la interacción de estos residuos con las tres zonas hidrofóbicas situadas en el centro activo de la ECA (Qian et al., 2007; Cushman y Cheung, 1971). La carga positiva asociada con la arginina o lisina en el extremo C-terminal también ha sido asociada con la actividad inhibidora de algunos péptidos (Hayes

et al., 2007). En el caso de péptidos con más de tres aminoácidos, ha sido sugerido que la presencia de hidroxiprolina es importante para que el péptido se una a la enzima (Saiga et al., 2003). Otra característica común de los péptidos inhibidores de la ECA es la naturaleza hidrofóbica del extremo N-terminal (Wijesekara y Kim, 2010; Rho et al., 2009). De hecho, la hidrofobicidad del péptido es importante y así los péptidos hidrofílicos tienen una débil o no tienen actividad inhibidora por ser incompatibles con los sitios activos de la ECA, a diferencia de los péptidos hidrofóbicos que tienen gran afinidad por los sitios activos de la ECA (Matsui et al., 2006; Li et al., 2004; Maruyama et al., 1987), mostrando por tanto mayor poder de inhibición.

2.2.4 Péptidos antihipertensivos de origen animal

2.2.4.1 Péptidos originados de la miosina

La miosina es la proteína que constituye los filamentos gruesos del músculo esquelético. En el músculo estriado, los filamentos de miosina se extienden junto con los filamentos delgados de actina y otras proteínas para formar las miofibrillas. Arihara et al., (2001) identificó dos pentapéptidos inhibidores de la ECA, derivados de la digestión de miosina porcina con la enzima termolisina. Estos péptidos fueron MNPPK e ITTNP y su administración a ratas espontáneamente hipertensas a una concentración de 1 mg por kilo de peso de animal resultó en una bajada máxima de presión sanguínea sistólica pasadas 6 horas desde la administración de 23.4 ± 3.0 mmHg y 21.0 ± 3.1 mmHg, respectivamente.

Otros péptidos inhibidores de la ECA y que mostraron actividad antihipertensiva *in vivo* son el octapéptido VKKVLGNP (Katayama et al., 2007) y el péptido KRVITY (Muguruma et al., 2009) ambos procedentes de la hidrólisis con pepsina de la miosina B.

2.2.4.2 Péptidos originados de troponina y fuentes derivadas.

El péptido bioactivo RMLGQTPTK se generó a partir de la proteína reguladora troponina C (Katayama et al., 2003) tras la digestión con pepsina mostrando un valor de IC_{50} de 34 μ M. Posteriormente se describió un péptido con la secuencia de amino ácidos KRQKYDI (Katayama et al., 2008) tras la digestión con la misma enzima mostrando un valor de IC_{50} de 26.2 μ M y además, la administración del péptido a ratas hipertensas resultó en una reducción temporal de la presión sanguínea sistólica.

Muchos estudios sobre la generación de péptidos bioactivos a partir de alimentos se realizan simulando la digestión humana *in vitro* ya que dichos péptidos pueden ser generados tras la digestión de las proteínas del alimento mediante la acción de varias enzimas digestivas. En una investigación reciente sobre la generación de péptidos bioactivos a partir de la carne de cerdo se utilizó una combinación de pepsina y pancreatina (Escudero et al., 2010). Los péptidos inhibidores de la ECA identificados en este estudio resultaron ser homólogos de secuencias de amino ácidos de la proteína muscular titina, entre otras. Es la primera vez que se encuentran péptidos inhibidores de la ECA procedentes de la titina. El péptido más activo fue el péptido KAPVA, con un valor de IC_{50} de 46.56 μ M. Otros péptidos identificados en este hidrolizado pueden verse en la **Tabla 2**, mostrada anteriormente.

2.2.4.3 Péptidos originados del colágeno.

El tejido conectivo está principalmente compuesto de colágeno del cual también se han estudiado péptidos inhibidores de la ECA, como por ejemplo péptidos purificados del hidrolizado de la gelatina de la piel de bovino (Kim et al., 2001). En este estudio se emplearon cinco proteasas (alcalasa, quimotripsina, neutrasa, pronasa E y tripsina) y se aislaron dos péptidos inhibidores de la ECA con una

secuencia de amino ácidos GPV y GPL (ver **Tabla 2**). La pechuga de pollo ha sido también identificada como una fuente potencial de péptidos inhibidores de la ECA (Saiga et al., 2003). Los investigadores administraron hidrolizado de pechuga de pollo con proteasa de *Aspergillus* a ratas hipertensas de manera espontánea y su presión sanguínea sistólica disminuyó significativamente tras las ingesta. La presencia de amino ácidos aromáticos en la posición antepenúltima y la fenilalanina en el extremo C-terminal serían responsables del efecto inhibitorio de la ECA por parte de los péptidos (**Tabla 2**). Este hecho apoyaría la teoría de que los péptidos inhibidores de la enzima basarían su actividad en la presencia de amino ácidos hidrofóbicos localizados en la parte final del extremo C-terminal del péptido.

2.3 Péptidos antioxidantes

Los radicales libres son una especie química (orgánica o inorgánica), generalmente extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo por poseer un electrón desapareado. Estos radicales libres son generados a través de reacciones normales en organismos durante la respiración aerobia, que aunque imprescindible para la vida celular de nuestro organismo, también induce la formación de estas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas ("oxidación") (Evans et al., 2003; Je et al., 2007). Además de la producción fisiológica de oxidantes, hay otras fuentes de producción de los mismos. La oxidación de grasas y aceites durante el procesado y el almacenamiento de alimentos deterioran la calidad de los lípidos y por tanto su valor nutritivo. Además, el consumo de estos productos potencialmente tóxicos podrían ocasionar enfermedades (Je et al., 2007). Los contaminantes del aire y los oxidantes del tabaco pueden también causar reacciones peligrosas en la piel o

pueden ser absorbidos por el torrente sanguíneo y provocar efectos adversos (Boffetta y Nyberg, 2003; Youn et al., 1992). Además, la radiación UV puede estimular la generación de una gran variedad de oxidantes.

Los radicales libres, producidos fisiológicamente no son dañinos por naturaleza ya que pueden ejercer diversas funciones beneficiosas como señal de alarma y defensa de la célula contra infecciones. El cuerpo tiene además mecanismos para contrarrestarlos. Sin embargo, una excesiva cantidad de radicales reactivos puede resultar en daño celular. Según la teoría desarrollada por Denham Harman (1956), los organismos envejecen cuando los radicales libres se acumulan en células y van dañándolas. Por lo general, las especies reactivas pueden causar daño en proteínas y mutaciones en ADN, oxidación de la membrana de fosfolípidos y la modificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Alaiz et al., 1994; Lee et al., 2004). Todo ello es origen de enfermedades como aterosclerosis, artritis, diabetes y cáncer (Halliwell, 1994; Jadhav et al., 1996)

En condiciones normales, el sistema de defensa antioxidante del organismo puede eliminar las especies reactivas a través de antioxidantes enzimáticos (como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa) y antioxidantes no enzimáticos (como vitaminas antioxidantes, elementos traza, coenzimas y cofactores). Sin embargo, en ciertas circunstancias el sistema de defensa endógeno falla a la hora de proteger el organismo contra radicales reactivos. Esto resulta en un estrés oxidativo en el que la generación de moléculas muy reactivas como las especies oxígeno reactivas y las especies nitrógeno reactivas exceden de su eliminación y/o su eliminación es inadecuada (Maritim et al., 2003). En los humanos, el estrés oxidativo normalmente juega el papel de promotor y no de iniciador de enfermedades crónicas (Rice-Evans y Diplock, 1992).

Esto nos lleva a la conveniencia de reforzar el aporte externo de antioxidantes sintéticos o naturales, que puedan prevenir el estrés oxidativo y sus efectos

perjudiciales. Los antioxidantes sintéticos son baratos y eficientes pero tienen algunos efectos tóxicos y peligrosos (Ito et al., 1985). Los antioxidantes naturales de fuentes alimentarias han sido el foco de atención por el creciente interés en su potencial beneficio para la salud y sin efectos secundarios. Además, hay una tendencia cada vez más creciente entre los consumidores a elegir antioxidantes naturales en vez de sintéticos.

2.3.1 Péptidos antioxidantes de proteínas de alimentos

Péptidos procedentes de ingredientes proteicos han mostrado capacidad antioxidante y su actividad biológica ha sido ampliamente estudiada desde que este efecto fue descrito por primera vez por Marcuse (1960). Los péptidos antioxidantes contienen entre 5 y 16 residuos de aminoácidos (Chen et al., 1996) y son considerados compuestos seguros y saludables con bajo peso molecular, bajo coste, elevada actividad y fácil absorción. Muestran algunas ventajas en comparación con los antioxidantes enzimáticos; con una estructura más simple, tienen más estabilidad en diferentes situaciones y no dan reacciones inmunes peligrosas. Además, presentan otras propiedades de interés como las nutricionales y funcionales (Hattori et al., 1998; Xie et al., 2008). Los estudios que investigan los efectos sobre la salud de los péptidos antioxidantes lo hacen de dos maneras: como hidrolizados de proteínas precursoras o como péptidos bioactivos aislados. El hidrolizado es una mezcla principalmente compuesta de péptidos y aminoácidos que se producen por la hidrólisis enzimática de las proteínas, por tratamiento ácido o básico, o por fermentación o curado. Cuando la proteólisis es inducida por proteasas endógenas se emplea el término "autolisado" en vez de "hidrolizado".

Se ha observado que el hidrolizado no purificado de proteína podría presentar ciertas ventajas frente a péptidos purificados ya que la absorción de oligopéptidos

puede verse aumentada en presencia de azúcares y aminoácidos (Pappenheimer y Volpp, 1992). Además, se ha visto que los hidrolizados presentan actividad antioxidante más elevada que los péptidos purificados.

2.3.1.1 Péptidos antioxidantes procedentes de la carne

Los péptidos derivados de las proteínas miofibrilares del cerdo tras su digestión con proteasas papaína y actinasa E representan el primer estudio de péptidos antioxidantes derivados de las proteínas miofibrilares de carne para consumo (Saiga et al., 2003). Tras la digestión, estos hidrolizados crudos inhibieron la peroxidación del ácido linoleico, presentaron actividad secuestradora del radical DPPH y actividad quelante de metales. La purificación de los péptidos responsables de la actividad antioxidante en los hidrolizados de papaína resultó en la identificación de cinco péptidos: DSGVT (actina), IEAEGE (origen desconocido), DAQEKLE (tropomiosina), EELDNALN (tropomiosina) y VPSIDDQEELM (cadena pesada de miosina).

Un cocktail de enzimas incluyendo pepsina, papaína y proteasas procedentes de páncreas bovino y proteasas bacterianas de *Streptomyces* y *Bacillus polymyxa*, fue utilizado para hidrolizar el colágeno porcino (Li et al., 2007). El resultado fue la liberación del péptido antioxidante QGAR, el cual fue identificado como residuo 72-75 y 180-183 de la cadena alfa1 del colágeno. Se propuso que el residuo de aminoácidos QG podría ser un factor contribuyente para la actividad secuestradora del radical DPPH.

Las proteínas del plasma representan otra fuente proteica valiosa pero no aprovechada. Siguiendo una hidrólisis con alcalasa, hidrolizados del plasma porcino mostraron ser inhibidores efectivos de la oxidación de lípidos, así como efectivos secuestradores de DPPH, quelantes de metales y agentes reductores (Liu et al., 2010). Incrementando el grado de hidrólisis incrementó la actividad

antioxidante y las fracciones más activas fueron menores a 3 kDa. El péptido con una masa molecular de 441Da y la secuencia de aminoácidos HNGN fue identificado con péptido antioxidante.

La esencia de pollo, un producto tradicional consumido en China mostró poseer varias actividades antioxidantes tales como la inhibición de la autoxidación del ácido linoleico, actividad captadora o secuestrante del radical DPPH, poder reductor y la habilidad para quelar iones metálicos (Wu et al., 2005). Se identificaron dos péptidos que mostraron inhibición de la autoxidación del ácido linoleico en un sistema modelo. Finalmente, la digestión de carne de venado con papaína presentó una fuerte actividad antioxidante. Se identificaron dos péptidos como responsables de dicha actividad: MQIFVKLTG y DLSGGEQGV (Kim et al., 2009).

2.3.2 Mecanismo de actuación de los péptidos antioxidantes.

El mecanismo exacto de la actividad antioxidante de péptidos aun no está esclarecido. Varios estudios han expuesto que estos péptidos son inhibidores de la peroxidación de lípidos, atrapadores de radicales libres y quelantes de iones metálicos de transición (Qian et al., 2008; Rajapakse et al., 2005). Además, los péptidos antioxidantes mantienen a las células a salvo de daños por estrés oxidativo (aumento en gran manera de radicales libres) a través de la inducción de genes. En este sentido, el péptido Met-Tir del músculo de sardina previene el estrés oxidativo estimulando la expresión de hemo oxigenasa-1 y ferritina en células endoteliales (Erdmann et al., 2006).

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad (Chen et al., 1998). T, W, M, K, C e H son ejemplos de aminoácidos con actividad antioxidante (Wang y De Mejía., 2005). Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a radicales con

deficiencia en electrones. Esta propiedad favorece la propiedad atrapadora de radicales de los residuos de aminoácidos (Rajapakse et al., 2005).

Además de la presencia de los aminoácidos adecuados, su correcta posición en la secuencia del péptido juega una función importante en la actividad antioxidante de los péptidos. Saito et al. (2003) observó que cualquier cambio en la distribución de aminoácidos en la secuencia de tripéptidos resultaba en diferentes actividades antioxidantes.

La **Tabla 3** recoge información relacionada con el efecto de la composición en aminoácidos y su correcta posición en la secuencia de péptidos.

La concentración de péptido y de proteína tienen también efecto en la actividad antioxidante (Chen et al., 2007), así como el peso molecular de los mismos. Por ejemplo, la actividad antioxidante de los hidrolizados del gluten del maíz estaba muy relacionada con la concentración y el peso molecular de los hidrolizados y la actividad antioxidante de péptidos de entre 500-1500 Da era más elevada que la de péptidos por encima de 1500 Da (Li et al., 2008).

Tabla 3. Composición en aminoácidos y su posición en relación con la actividad antioxidante de los péptidos.

Aminoácidos	Mecanismo de acción	Ejemplos
Aminoácidos aromáticos (Tyr, His, Trp, Phe)	Convertir radicales en moléculas estables donando electrones y manteniendo su propia estabilidad a través de la estructura de resonancia. Mejorar la propiedad de captación de radicales de los residuos de aminoácidos ^a	His en N-terminal quelante de iones metálicos
		His en C-terminal atrapa radicales
		Tripéptidos con Trp o Tyr en C-terminal fuertes secuestrantes de radicales pero débil con peroxinitritos.
Aminoácidos hidrofóbicos	Aumentar la solubilidad del péptido en lípidos lo que facilita la accesibilidad a especies radicales hidrofóbicas y PUFAs hidrofóbicos. Gly como donante de hidrógeno ^b	Val o Leu en N-terminal y Pro, His, Tyr en secuencias
		Alta reactividad de grupos alifáticos en Ala, Val, Leu en PUFAs hidrofóbicos
		Ala o Leu al final, Gln y un residuo de Pro en la secuencia de péptidos del gluten.
Amino ácidos básicos y ácidos	Grupos carboxil y amino en cadenas laterales como quelantes de iones metálicos y como donantes de hidrógeno ^c	Residuos de Asp (ácido) e His (básico) en péptido purificado de salsa fermentada de mejillón
Cisteína	Grupo SH como captador de radicales, protegiendo el tejido de stress oxidativo, mejorando la actividad del glutatión ^d	Tripéptidos con Cys como fuente atrapadora de radicales peroxinitrito.
		Proteínas de hojas de curri con grupos SH junto con otros grupos funcionales

^aRajapakse et al. 2005 ; ^b Quian et al. 2008, Chen et al. 1998, Suetsuna y Chen, 2002; ^c Suetsuna et al. 2000, Quian et al. 2008; ^d Selvam y Devaraj, 1996

2.3.3 Efecto en la salud de los péptidos antioxidantes

Como se mencionó anteriormente, los radicales libres están involucrados en la iniciación o progreso de algunas enfermedades degenerativas. Por ejemplo, evidencias recientes sugieren que el estrés oxidativo puede contribuir a la diabetes tipo II por el aumento de la resistencia a la insulina o daño en la secreción de la misma. La generación incontrolada de radicales libres empeora el desarrollo y la progresión de la diabetes y sus complicaciones (Johansen et al., 2005). También se ha sugerido que el estrés oxidativo tiene una función importante en la iniciación o progreso de complicaciones cardiovasculares en pacientes con síndrome metabólico (Palmieri et al., 2006). Además, un exceso de radicales libres es fundamental en el desarrollo del cáncer.

Dada la estrecha relación entre el estrés oxidativo y enfermedad, el control de dicho estrés parece ser uno de los pasos cruciales para controlar el progreso de estas enfermedades o prevenir sus complicaciones. En este sentido, un extenso número de antioxidantes fueron aislados e identificados de fuentes naturales al objeto de estudiar su efecto in vivo. Además de varios conocidos antioxidantes naturales como la vitamina C y E polifenoles, flavonoides, carotenoides y selenio, los péptidos con propiedades antioxidantes también han sido el foco de investigaciones recientes. Por ejemplo, la ingesta de extracto Douchi (soja fermentada) por parte de ratas tuvo el efecto de incrementar la actividad superóxido dismutasa en hígado y riñones, la actividad catalasa en hígado, la actividad glutatión peroxidasa en riñones así como disminuir las sero sustancias tiobarbitúricas ácido-reactivas en hígado y riñones. Estos resultados fueron atribuidos a péptidos y aminoácidos libres del extracto de Douchi, el cual actuó como antioxidante (Wang et al., 2008). Además, péptidos tales como la carnosina, la anserina y el glutatión son conocidos por su actividad antioxidante endógena (Babizhayev et al., 1994).

2.4 Biodisponibilidad de péptidos bioactivos

La digestión es la barrera potencial para que los péptidos tengan una aplicación real al alcanzar los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Durante el proceso natural de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos o liberarlos del seno de su proteína de origen donde se encontraban inactivos, presentando propiedades especiales una vez liberados. Por lo tanto, para que los péptidos sean utilizados como nutracéuticos y ejerzan un efecto fisiológico *in vivo* después de su administración oral, es de crucial importancia que permanezcan activos durante la digestión y absorción gastrointestinal para que puedan alcanzar el sistema cardiovascular. Los principales factores que afectan a la absorción oral de los péptidos son las diferencias metabólicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del tracto gastrointestinal, la actividad enzimática del mismo, la pobre permeabilidad de los biopéptidos al cruzar las membranas biológicas así como su naturaleza hidrofílica y tamaño molecular (Lee, 2002).

No obstante, algunos fragmentos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis y son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y alcanzar intactos la circulación sanguínea (Robert y Zaloga, 1994). Lo anterior, solo es posible si el péptido atraviesa las barreras potenciales de la activación o inactivación que pudieran hacerle perder su acción biológica (Yamamoto et al., 1999) (ver **Figura 5**).

Una pequeña porción de péptidos bioactivos pueden pasar la barrera del intestino y aunque esta porción es pequeña para considerarla nutricionalmente importante, esta puede tener efectos biológicos a nivel tisular (Gardner, 1988). La absorción intacta de los péptidos está considerada como un proceso fisiológico normal aunque diferente de la ruta normal de transporte de péptidos (Gardner, 1988).

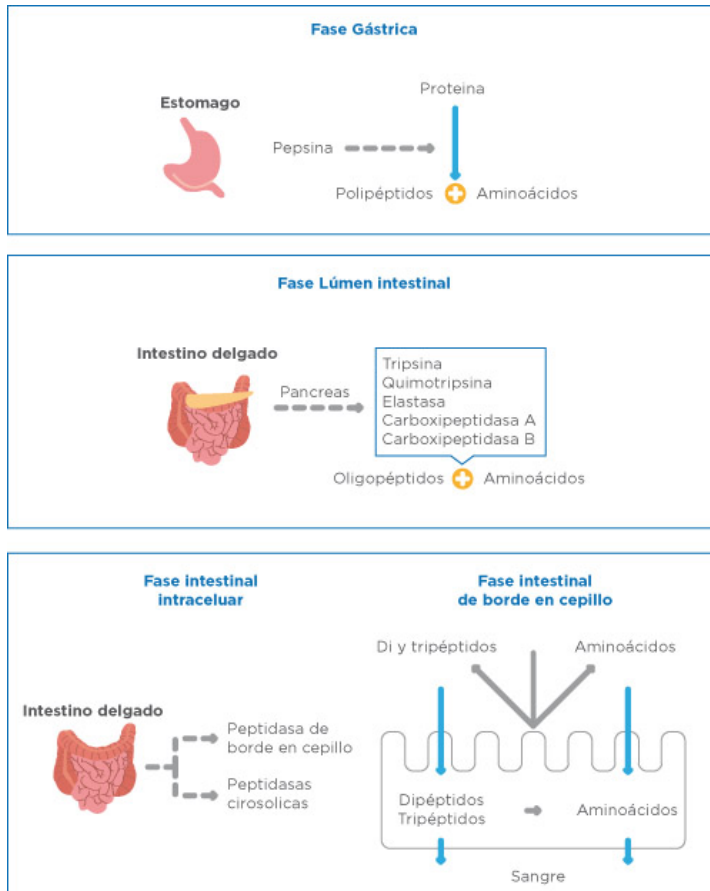


Figura 5. Barreras potenciales de activación o inactivación de los péptidos durante la digestión.

La **Tabla 4** presenta algunos de los mecanismos para la absorción intacta de péptidos, incluyendo: la ruta paracelular, difusión pasiva, transporte vía portador, endocitosis y sistema linfático.

Los péptidos y las proteínas pueden escapar de la digestión y ser absorbidos de forma intacta a través del espacio intersticial hacia el sistema intestinal linfático. Esta habilidad está afectada por su permeabilidad vía capilaridad de la circulación portal y la solubilidad en lípidos (Deak y Csàky, 1984). El tamaño molecular y

propiedades estructurales, como la hidrofobicidad, afectan la mayoría de rutas de transporte de los péptidos.

Tabla 4. Posibles rutas de absorción intacta de péptidos

Ruta de transporte	Mecanismo	Candidatos	Referencia
Ruta paracelular	Difusión a través de estrechos espacios intercelulares por un proceso de difusión pasiva	Péptidos grandes solubles en agua	Gardner, 1988
Difusión pasiva	Difusión transcelular por un proceso de difusión pasiva	Péptidos hidrofóbicos	Ziv y Bendayan, 2000
Vía transportador	Salida de algunos péptidos del enterocito a la circulación portal via transportador de péptidos localizado en la membrana basolateral intestinal	Péptidos pequeños resistentes a hidrólisis	Gardner, 1984
Endocitosis	Enlace de moléculas a la células y su absorción por las células via vesiculización	Normalmente péptidos grandes y polares	Gardner, 1988; Ziv y Bendayan, 2000
Sistema linfático	Absorción de péptidos desde el espacio intersticial al sistema linfático intestinal	Péptidos muy lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos en la circulación portal	Deak y Csaky, 1984; Rubas y Grass, 1991

Roberts et al. (1999) estudió que los péptidos pequeños (di- y tripéptidos) y más grandes (10-51 aminoácidos) pueden cruzar la barrera intestinal intactos y ejercer su función biológica. Sin embargo, conforme el peso molecular de los péptidos aumenta, su oportunidad de pasar la barrera intestinal disminuye.

Es importante saber que la presencia de prolina e hidroxiprolina resulta en una resistencia de los péptidos a las enzimas digestivas, especialmente en tripéptidos

con Pro-Pro en el extremo C-terminal que son resistentes a determinadas peptidasas (Fitzgerald y Meisel, 2000).

Por otro lado, se ha sugerido que una actividad elevada *in vivo* puede deberse a un aumento de actividad de los péptidos tras una posible ruptura en fragmentos más pequeños por las proteasas gastrointestinales (Li et al., 2004).

3. Métodos analíticos para la separación, purificación e identificación de péptidos bioactivos de la carne y/o productos cárnicos.

El análisis de los péptidos bioactivos de la carne y productos cárnicos se realiza de forma similar al análisis de péptidos en general, solo que tras diversas etapas del proceso se incluye la medida de la actividad objeto de estudio (inhibidora de la ECA, antihipertensiva, antioxidante, etc.) para asegurar la recuperación de la misma a lo largo del proceso. La **Figura 6** muestra el típico procedimiento para el estudio de los péptidos bioactivos.

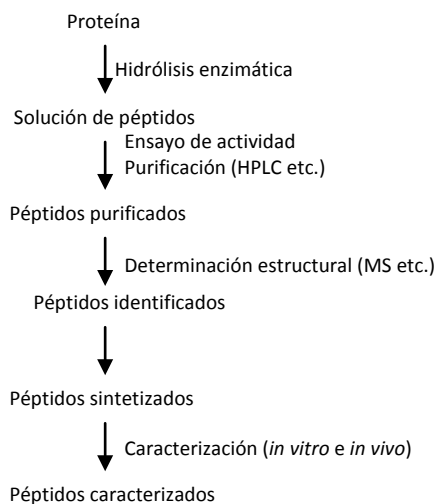


Figura 6. Típico procedimiento experimental para el estudio de péptidos bioactivos derivados de proteínas de alimentos.

En este apartado se detallan las distintas etapas de las que consta el análisis: extracción, separación, aislamiento e identificación, mientras que en el apartado siguiente se tratarán los métodos de medida de la actividad biológica. La combinación de diferentes técnicas analíticas es útil no sólo para la purificación de péptidos, sino también para la identificación estructural de los mismos.

3.1 Extracción de péptidos en carne y productos cárnicos

Para analizar péptidos presentes en carne y productos derivados la extracción es una etapa esencial. Una vez eliminada la grasa y el tejido conectivo del tejido muscular, se pica la muestra por método mecánicos y se toma una muestra representativa para el posterior análisis. Esta muestra es homogeneizada posteriormente con el disolvente de extracción siendo los más empleados el agua bidestilada, soluciones salinas diluidas, soluciones acuosas ácidas (acético, clorhídrico o perclórico), tampón fosfato neutro o incluso mezclas de agua con disolventes orgánicos. Concretamente, en carne y productos derivados se suelen emplear soluciones ácidas como el ácido clorhídrico 0.01N (Rodríguez-Núñez et al., 1995; Mora et al., 2008). Tras la centrifugación del extracto, el sobrenadante se recoge y se desproteíniza añadiendo 3 volúmenes de acetonitrilo, metanol o etanol. A veces, la extracción y desproteínización se pueden realizar en un solo paso extrayendo la muestra con un solvente desproteínizante como puede ser el ácido perclórico 0.6N (Dunnett y Harris, 1997; Martín et al, 2001; Liu et al, 2007) o el ácido tricloroacético (Hughes et al, 2002). La muestra desproteínizada contiene un extracto de péptidos solubles y aminoácidos. Dicho extracto se concentra y se continúa con el análisis.

3.2 Técnicas de separación

El análisis de péptidos requiere un fraccionamiento previo para simplificar la muestra y eliminar sustancias que están presentes en el extracto y que puedan interferir. Los métodos de separación se basan en diferentes principios como el fraccionamiento por tamaño (ultrafiltración, cromatografía de exclusión molecular), la carga o la polaridad (electroforesis y cromatografía).

3.2.1 Ultrafiltración

La actividad biológica de los péptidos está relacionada con su peso molecular (Berot et al., 2001). Con la ultrafiltración es posible aislar la fracción peptídica de interés según su tamaño molecular, aunque también se puede usar como medio para concentrar extractos de péptidos. El uso de membranas de nanofiltración ha sido una mejora en la separación por membranas. La selectividad de estas membranas depende del tamaño y la carga de las moléculas (Rautenbach y Gröschl, 1990). Los efectos del pH y la fuerza iónica descritos en varios estudios (Mullet et al., 1999; Cheang and Zydney, 2004) revelaron que la separación de péptidos por membranas está principalmente basada en los efectos de la carga.

3.2.2 Cromatografía de exclusión molecular

Esta cromatografía, también denominada cromatografía de filtración en gel, se ha utilizado para separar proteínas y péptidos en función de su tamaño molecular. La fase estacionaria es un gel con un intervalo de tamaño de poro controlado de manera que las moléculas de muestra más pequeñas se adentran en los poros del relleno mientras que las de mayor tamaño que el diámetro de poro son excluidas y eluyen más rápidamente. El resultado de esta cromatografía es una separación en la que los péptidos de mayor tamaño molecular eluyen antes que los péptidos de menor tamaño. El intervalo de tamaños a fraccionar depende del tipo de gel.

Por ejemplo, un gel Sephadex G-25 (GE Healthcare) es adecuado para separar péptidos de tamaño entre 500 y 5.000 Da (Spanier et al., 1988; Rodríguez-Núñez et al., 1995; Hughes et al., 2002; Mora et al., 2009), mientras que un gel Sephadex G-10 sería adecuado para separar péptidos menores de 700 Da (Cambero et al., 1992; Hughes et al., 2002).

La elución de péptidos normalmente se realiza con ácido clorhídrico 0.01N o tampones fosfato diluidos a velocidades de flujo muy bajas. El eluyente se monitoriza por absorción ultravioleta a 214, 254 o 280 nm con el fin de controlar la elución de los compuestos de interés. La **Figura 7** muestra un cromatograma típico de un extracto de jamón curado. Las fracciones son colectadas tras la elución para utilizarlas en análisis posteriores.

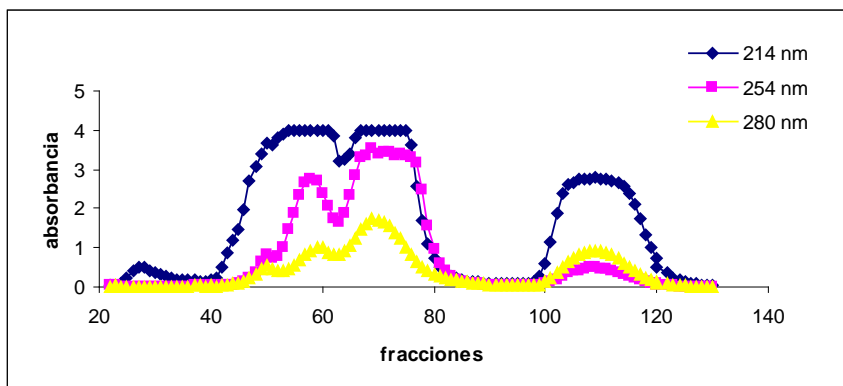


Figura 7. Cromatografía de filtración en gel con una columna Sephadex G-25 de un extracto de jamón curado previamente desproteinizado.

3.2.3 Electroforesis en gel

La tecnología más utilizada para la separación de proteínas y péptidos es la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), tanto de una dimensión, donde la separación se realiza en función de la masa molecular en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), como bidimensional, que está basada en una primera separación en función del punto isoeléctrico utilizando un gradiente de pH,

seguida de una segunda separación en función de la masa molecular. El uso más habitual de la PAGE es la separación de proteínas desde 200.000 Da hasta péptidos de 3000 Da a base de ajustar el porcentaje de acrilamida en el gel. Esta electroforesis "estándar" utiliza glicina en el tampón. La sustitución de glicina por tricina, permite sin embargo la separación de péptidos de hasta 500 Da (Simpson, 2006) y se ha utilizado en una o dos dimensiones (Shägger, 2006).

La electroforesis en gel se ha utilizado mucho en el estudio de los cambios postmortem del músculo esquelético, lo que ha contribuido a conocer mejor los mecanismos bioquímicos que tiene lugar durante el periodo de almacenamiento de la carne de cerdo (Lametsch y Bendixen, 2001) así como de otros animales y pescados (Jia et al., 2006a; Verrez-Bagnis et al., 2001; Kjaersgard y Jessen, 2003). Recientemente se ha desarrollado un fraccionador basado en la separación en medio líquido y sin límites de pH o de tamaño molecular. El tradicional gel de acrilamida ha sido sustituido por una fase líquida, la cual permite la recogida de distintas fracciones para posteriores análisis sin necesidad de la fase de extracción en gel que era necesaria en la electroforesis SDS-PAGE. Esta electroforesis denominada Offgel permite la separación de proteínas y péptidos según su punto isoeléctrico (Fraterman et al., 2007)

3.2.4. Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC).

RP-HPLC es la técnica más utilizada para analizar extractos peptídicos, ya que permite separarlos en base a diferencias de hidrofobicidad, lo que está directamente relacionado con la composición en aminoácidos de los péptidos. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es apolar mientras que la fase móvil es polar. Existen muchos tipos de columnas de fase reversa; las más utilizadas consisten en un soporte de sílice con cadenas n-alkil enlazadas con grupos octadecil (C18) y octil (C8). Las típicas fases móviles que se emplean en

este tipo de separaciones son el acetonitrilo como fase orgánica y una fase acuosa compuesta generalmente de un 0.1% de ácido trifluoroacético o ácido fórmico en agua (Sforza et al., 2006). Para conseguir una separación óptima de los péptidos se suele realizar una elución en gradiente en la que se aumenta la hidrofobicidad de la fase móvil. Los péptidos se reparten entre fase móvil y estacionaria en base a su polaridad, y como resultado los más polares eluyen en primer lugar y los hidrofóbicos quedan retenidos en la columna y tardan más tiempo en eluir. La detección de los péptidos puede realizarse a diferentes longitudes de onda (214, 254 o 280 nm), aunque si el sistema cuenta con un detector de diodos es posible obtener el espectro completo de absorción para cada péptido.

La gran eficacia que se obtiene con esta técnica permite la obtención de los denominados mapas peptídicos (Colilla et al., 1991) a partir de digestiones proteicas o de extractos de péptidos en general. La eficacia de esta técnica permite el aislamiento de péptidos para su estudio o identificación posterior (Recio et al., 2000; Fogaça et al., 2004), así como el seguimiento de su evolución durante los procesos en los que existe proteólisis tal y como ocurre en el caso del jamón curado o el queso (Rodríguez-Núñez et al., 1995; Michaelidou et al., 2003).

3.2.5 Cromatografía de intercambio iónico (CII)

Este tipo de cromatografía también permite una separación de péptidos en este caso en función de la carga, siendo así complementaria a la anteriormente descrita. En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta del analito. En este sentido, la cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente como un ácido sulfónico o carboxílico, mientras que la cromatografía de intercambio de aniones retiene

aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario o una amina. Por lo tanto, los péptidos de carácter ácido se separan mejor en columnas de intercambio aniónico (Pizzano et al., 1998), mientras que para el análisis de péptidos con carácter básico se suelen emplear columnas de intercambio catiónico (Recio et al., 2000; Sentandreu et al., 2003). Los mejores resultados se suelen obtener utilizando sales no volátiles como el cloruro sódico, lo que presenta un gran inconveniente cuando se requieren posteriores identificaciones por espectrometría de masas. Para superar este problema, la separación por intercambio iónico suele ir seguida de una cromatografía en fase reversa o de interacción hidrofílica con el fin de eliminar la sal de los péptidos de interés, antes de analizarlos por espectrometría de masas.

3.2.6 Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

Tanto la RP-HPLC como la CII han sido durante mucho tiempo los métodos elegidos para el análisis de péptidos. Sin embargo, si bien la CII es adecuada para compuestos muy polares la RP-HPLC presenta algunas limitaciones en el análisis de estos compuestos debido a la baja retención de los mismos. En este sentido, la HILIC constituye una alternativa interesante a estos tipos de cromatografía por muchas razones. Esta técnica emplea fases móviles similares a las empleadas en fase reversa, con la consecuente ventaja sobre la solubilidad del analito, sin embargo, no precisa del uso de agentes derivatizantes o pares iónicos, generalmente necesarios en RP-HPLC cuando se analizan compuestos muy polares. Por otro lado, se trata de una cromatografía líquida perfectamente compatible con espectrometría de masas, eliminando el paso de desalado que es necesario cuando se utiliza la CII, ya que en el caso de utilizar sales, éstas son volátiles y compatibles con la espectrometría de masas.

Así, la cromatografía de interacción hidrofílica es complementaria a la cromatografía de fase reversa. Compuestos que presentan poca o ninguna retención en fase reversa suelen presentar una fuerte retención en columnas HILIC. El tiempo de retención en este tipo de cromatografía aumenta con la polaridad del péptido y la concentración en disolvente orgánico de la fase móvil, por lo que en esta cromatografía los gradientes se basan en disminuir el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil durante el análisis.

Aunque se han descrito estudios sobre el empleo de este tipo de cromatografía en la separación de péptidos (Alpert, 1990; Yoshida et al., 1995; Dunnett et al., 1997; Yoshida, 2004), no existen prácticamente registros sobre su aplicación en el análisis de alimentos.

3.3 Identificación y secuenciación

Para la identificación de proteínas se han desarrollado dos estrategias diferentes entre las que se incluyen la identificación mediante huella peptídica y la identificación *de novo* mediante fragmentación escalonada de los péptidos, obteniendo así la secuencia total o parcial de los aminoácidos. En la huella peptídica, la proteína desconocida en estudio se hidroliza por acción de proteasas específicas de secuencia con patrón de corte conocido (generalmente la tripsina) en pequeños péptidos cuyas masas absolutas pueden determinarse mediante un espectrómetro de masas acoplado al detector adecuado. Las masas obtenidas son comparadas con una base de datos biológica de proteínas cuya secuencia se conoce.

Recientemente han aparecido trabajos en los que la investigación se centra en la identificación de péptidos presentes en matrices complejas, y que se han generado a partir de procesos proteolíticos muy poco conocidos. La identificación de estos péptidos es más compleja que en el caso anterior, ya que no han sido

generados por digestión con una enzima de actividad conocida (tripsina, por ejemplo), y el perfil peptídico (huella peptídica) no es contrastable con las masas teóricas presentes en las bases de datos. En estos casos, los péptidos se deberían identificar por elucidación de su secuencia de aminoácidos mediante espectrometría de masas en tándem. De esta técnica se hablará más adelante.

3.3.1 Secuenciación de Edman

Este procedimiento supone la degradación secuencial de una proteína desde el extremo N-terminal y la identificación de los aminoácidos liberados uno a uno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En una primera etapa, el fenilisotiocianato reacciona con el N-terminal de la proteína. El aminoácido del extremo N-terminal se elimina como un derivado feniltiohidantoína, el cual es identificado por HPLC. El ciclo de degradación es repetido para identificar los siguientes aminoácidos.

A pesar de que esta técnica de secuenciación ha sido de gran utilidad durante décadas, presenta algunas limitaciones. Es una técnica lenta y poco sensible. La sensibilidad disminuye y las interferencias aumentan en cada paso del ciclo de Edman lo cual dificulta conseguir la secuencia completa de un polipéptido. Además, no es aplicable a péptidos o proteínas con el N-terminal bloqueado.

3.3.2 Identificación por espectrometría de masas

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de métodos de ionización suave para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa.

Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa. Esta técnica implica:

- La introducción de la muestra directamente o por acoplamiento a técnicas de separación como LC ó CE.

- La conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización-desorción con láser asistida por matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electrospray (ESI) de una muestra en solución.

- Separación de los iones según su relación m/z en un analizador de masas, como por ejemplo, los analizadores de tiempo de vuelo (Time of Flight, TOF), cuadrupolo, trampa iónica, etc.

- En algunos casos se realiza también una fragmentación opcional de determinados iones peptídicos seleccionados, mediante descomposición metaestable o mediante disociación inducida por colisión (CID). Para ello se utilizan espectrómetros de masas en tandem, combinando dos analizadores iguales o diferentes.

- Medida de las masas en un detector (fotomultiplicador o copa de Faraday) obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z .

Los espectros proporcionan información que ayuda a la identificación y localización de los aminoácidos en el péptido de tal forma que si se genera una fragmentación de buena calidad será posible determinar la secuencia completa del péptido. La **Figura 7** muestra el procedimiento típico a seguir en el análisis por espectrometría de masas:



Figura 7. Esquema de procedimiento típico en el análisis por espectrometría de masas.

Para la identificación de proteínas por MS se han desarrollado dos estrategias:

- Identificación mediante huella peptídica o mapeo peptídico utilizando un espectrómetro con analizador de tiempo de vuelo (TOF) del tipo MALDI-TOF.
- Identificación mediante fragmentación de péptidos para obtener la secuencia total o parcial de los aminoácidos utilizando un espectrómetro de masas en tandem (MS/MS).

La interpretación de los espectros de MS/MS se puede realizar por diferentes metodologías que serían las siguientes:

- Las secuencias son obtenidas directamente por diferencia de masas a partir de la información del espectro de fragmentación sin recurrir a las bases de datos (secuenciación *de novo*).

- Búsqueda en bases de datos para que la identificación de péptidos se lleve a cabo correlacionando los espectros de MS/MS experimentales con los teóricos contenidos en las bases de datos.

- Finalmente, existe una aproximación basada en la combinación de las dos anteriores que consiste en la identificación de un fragmento corto de la secuencia, entre tres y cinco residuos, seguido de una búsqueda en bases de datos.

Existen varias herramientas bioinformáticas que pueden utilizarse para la interpretación de los espectros de fragmentación de un péptido: SEQUEST, MASCOT, PARAGON, etc., las cuales trabajan con distintas bases de datos como son la SwissProt o el NCBIInr.

3.3.2.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

En esta técnica la muestra se deposita en una placa metálica junto con una matriz (moléculas que absorben una pequeña cantidad de energía, como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico o el ácido ciano-4-hidroxicinámico). Al evaporarse el disolvente se forman cristales. La placa se introduce en el analizador donde la muestra es irradiada con láser para ionizar las moléculas (ver **Figura 8**). Los iones formados son acelerados por un campo eléctrico hacia un detector. El valor m/z de cada ión viene determinado por el tiempo de vuelo hasta llegar desde la fuente de ionización al detector. Los iones más ligeros viajarán a mayor velocidad a lo largo de la zona de deriva y llegarán antes al detector, el cual registra los "tiempos de vuelo" de los distintos iones. El resultado es un espectro de masas en el que quedan representadas las masas moleculares (m/z) de los péptidos presentes en la muestra.

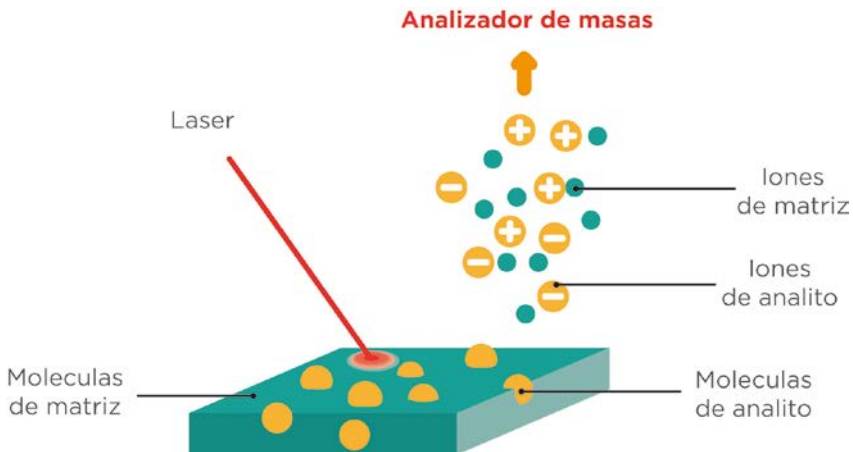


Figura 8. Esquema de ionización por MALDI.

La espectrometría de masas tipo MALDI-TOF se considera un pilar de la proteómica. El instrumento es robusto, relativamente caro y con posibilidades de ser automatizado. Como el tiempo de análisis de una muestra es muy corto se puede utilizar para análisis a gran escala. Además, permite la determinación de masas en un amplio intervalo, desde pequeños péptidos hasta proteínas (>100 KDa).

3.3.2.2 Espectrometría de masas en tandem

Se denomina espectroscopía de masas en tandem (MS/MS) al acoplamiento de dos espectrómetros de masas mediante una cámara que se encarga de fragmentar la molécula. Los espectrómetros de masas en tandem MS/MS permiten la determinación de la secuencia de aminoácidos. Tras la ionización, se selecciona un ión por la masa en un primer espectrómetro. El ión seleccionado se fragmenta por colisión con un gas y los fragmentos se analizan en un segundo espectrómetro. Puede utilizarse con fuentes de ionización tipo MALDI o ESI.

En la ionización mediante electrospray (ESI) los iones se forman a partir de una muestra en solución, que se vaporiza haciéndola pasar a través de una fina aguja a la que se aplica una alta diferencia de potencial. Las gotas cargadas pasan a una zona de potencial más bajo, y son desolvatadas, dando lugar a iones con carga múltiple. Es la fuente de ionización más adecuada para acoplar la cromatografía líquida al MS. El último avance de la espectrometría ESI-MS ha sido la introducción de microcapilares de borosilicato recubiertos de oro para la inyección de la muestra en el espectrómetro. A esta técnica se le ha denominado nanoelectrospray (nanoESI) y permite analizar volúmenes de muestra de 1-2 microL durante un periodo de tiempo de unos 30 minutos. En ESI hay varias formas de incorporar la muestra al espectrómetro. El método más sencillo es cargar tubos microcapilares individuales con la muestra y como se utiliza un tubo

nuevo para cada muestra, no hay contaminación. En ESI los péptidos requieren cierto grado de pureza.

Tanto la necesidad de purificar la muestra como la de cargar de forma manual los capilares hacen que esta técnica sea lenta y tediosa. Como alternativa, este tipo de espectrómetros suelen estar conectados en línea a un equipo de cromatografía líquida (LC) que de forma automática purifica e introduce la muestra en el espectrómetro.

Los espectrómetros de masas en tándem pueden ser de diferentes tipos:

- Triple cuadrupolo (acoplado a una fuente ESI). El primer cuadrupolo separa el ión de interés y éste es fragmentado en una cámara de colisión (CID) con un gas inerte. El tercer cuadrupolo mide la m/z de los productos de disociación.

- Híbrido cuadrupolo-TOF (Q-TOF). Combina un cuadrupolo, un hexapolo para la colisión y un analizador tipo TOF.

- Trampa de iones. La trampa, en último lugar, atrapa los iones que le llegan en un campo eléctrico 3D. A diferencia de los cuadrupolos, donde los iones que no son de interés, son eliminados antes de comenzar el análisis, la principal ventaja de la trampa es su capacidad para conservar los iones y posteriormente eliminarlos selectivamente.

- Recientemente se ha desarrollado un TOF en tándem con fuente de MALDI, MALDI/TOF-TOF. Los iones procedentes del primer TOF y fragmentados en una CID son reaccelerados y analizados en un segundo analizador tipo TOF.

3.3.2.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Una técnica alternativa para separar e identificar péptidos es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. En este caso, el método de ionización más adecuado es la ionización por electrospray (ESI) y más recientemente, la técnica de nanoelectrospray.

La **Figura 9** muestra un esquema de la cromatografía líquida en tandem con un espectrómetro de masas:

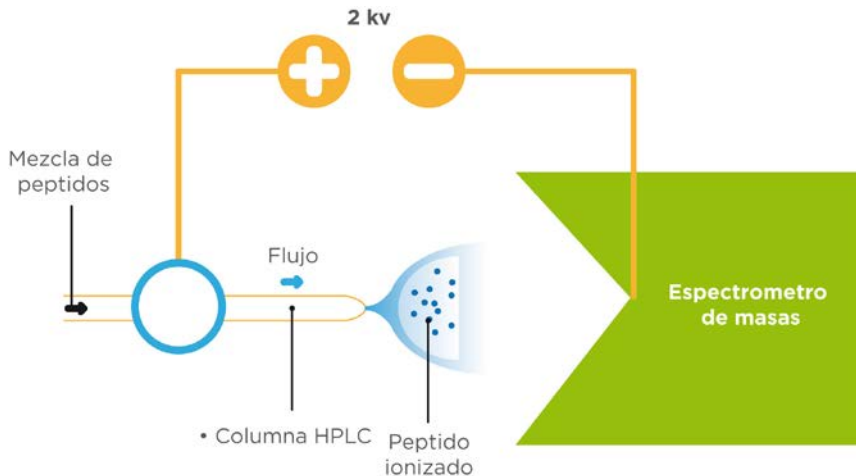


Figura 9. Esquema de cromatografía líquida en tandem con un espectrómetro de masas.

La principal diferencia de la ionización por ESI o por MALDI es que la ionización ESI suele generar iones con varias cargas a diferencia de los iones monocargados que se obtienen con la ionización MALDI. El espectro de masas obtenido puede por tanto mostrar varios picos correspondientes a la misma secuencia peptídica pero con diferentes cargas. Esto permite analizar muestras de alto peso molecular por espectrometría de masas dentro de un estudio de intervalo de masas moderado. Los analizadores que se utilizan en este caso son aquellos que conectan mejor con la fuente ESI, como los cuadrupolos o la trampa iónica y a partir de ahí se permite cualquier combinación en tandem.

4. Evaluación de la capacidad antihipertensiva y medida de la actividad antioxidante de los péptidos

4.1 Capacidad antihipertensiva

La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) está considerado como el principal mecanismo de acción de la actividad antihipertensiva de los péptidos derivados de alimentos. La ECA tiene un importante papel en el sistema renina-angiotensina, regulando la presión arterial, así como el balance sal-agua. La ECA convierte la angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor, al tiempo que degrada la bradiquinina, un potente vasodilatador (Takano, 1998).

4.1.1 Estudios *in vitro*

La medida de la reducción en la formación de angiotensina II *in vitro* es un test muy común para evaluar la inhibición de la ECA ejercida por diferentes medicamentos y péptidos procedentes de alimentos. El valor IC_{50} (la concentración de inhibidor que ejerce el 50% de inhibición) se emplea para comparar la efectividad de diferentes péptidos inhibidores de la ECA. Una vez el valor IC_{50} ha sido establecido, éste representará una aproximación del posible efecto antihipertensivo de estos compuestos (Li et al., 2005).

Muchos métodos pueden medir la habilidad de los péptidos de alimentos para inhibir la ECA *in vitro*. Uno de los más comúnmente utilizados fue desarrollado por Cushman y Cheung (1971), y posteriormente modificado por Nakamura et al. (1995). Este método emplea el compuesto hipuril-histidil-leucina (HHL) como sustrato de la ECA, el cual libera el dipéptido His-Leu y ácido hipúrico. La cantidad de ácido se cuantifica espectrofotométricamente a 228 nm una vez que ha sido extraído con etil acetato. Sin embargo, es un proceso tedioso que puede sobreestimar la actividad ECA si el HHL no hidrolizado también es extraído, aunque esto puede evitarse mediante la separación del HHL y la determinación cuantitativa por HPLC, que también tendría el

problema de ser un método largo para evaluar la actividad inhibidora de la ECA (Wu et al., 2002).

Otros métodos espectrofotométricos también han sido optimizados y validados. Tal es el caso del método basado en la liberación del dipéptido Gli-Gli cuando la enzima reacciona con el sustrato furanacrilil-Fe-Gli-Gli (Vermeirssen et al., 2002). Este método fue posteriormente evaluado y se recomendó detallar el número de unidades de enzima utilizadas e incluir en el estudio un patrón de inhibidor de la ECA, como el Captopril (Murray et al., 2004). Posteriormente, se desarrolló un ensayo de fluorescencia que emplea o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanilprolina como sustrato de la ECA (Sentandreu y Toldrá, 2006). La fluorescencia generada mediante la liberación del grupo o-aminobenzoilglicil es leída en un fluorímetro, resultando un método simple, rápido y sensible que permite la continua monitorización de la actividad de la ECA en un solo paso.

Un ensayo bioquímico basado en un flujo continuo de la reacción enzima-sustrato y la posterior detección de los productos de reacción por espectrometría de masas ha sido aplicado para el screening de extractos complejos de péptidos con actividad inhibidora de la ECA. La ventaja de este método es que el fraccionamiento de péptidos para posteriores test de actividad son evitados, aunque requiere un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (Boer et al., 2004). Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método TFC (turbulent flow cytometry)/ESI-MS-based screening que utiliza el sustrato ECA natural angiotensina I, en lugar de sustratos artificiales. El ensayo se lleva a cabo en un sistema offline atípico mediante la incubación de las muestras con ECA y angiotensina I seguido de la parada de la reacción con acetonitrilo conteniendo val5-angiotensin I, el cual sirve de patrón interno. La angiotensina I y el producto angiotensina II son extraídos de la mezcla de incubación por TFC aplicado en modo reflujo como una extracción en fase sólida online y son directamente cuantificados por ESI-MS. La presencia de inhibidores es

detectada por el aumento en la intensidad de señal de angiotensina I y el correspondiente descenso en la señal de angiotensina II, comparando con un blanco de ensayo. Esta medida en paralelo de la actividad inhibidora permite la exclusión de falsos positivos debidos a la interferencia de los compuestos de la matriz (Siemerink et al., 2010).

4.1.2 Estudios *in vivo*

No siempre se ha visto correlación entre la actividad inhibidora *in vitro* y la acción *in vivo*. Probablemente sea debido a que la selección de péptidos potencialmente antihipertensivos se ha basado únicamente en la determinación *in vitro* de la actividad inhibidora de la enzima, obviándose importantes aspectos, tales como las transformaciones fisiológicas que determinan la biodisponibilidad de los péptidos o la existencia de otros mecanismos de acción antihipertensiva (Vermeirssen et al., 2004). Es así que, para evaluar finalmente la actividad antihipertensiva de los péptidos, son necesarios experimentos con animales y humanos. En este sentido, se han realizado algunos estudios utilizando modelos con animales para determinar los efectos antihipertensivos de los péptidos tras tratamientos a corto y largo plazo (FitzGerald et al., 2004; Nakamura et al., 1995; Miguel et al., 2005; Muguerza et al., 2006; Miguel et al., 2006; Lopez-Fandiño et al., 2006; Miguel et al., 2009; Miguel et al., 2010).

Las ratas espontáneamente hipertensas, desarrolladas en ratas Wistar y criadas en la Universidad de Kioto (Okamoto y Aoki, 1963), constituyen el modelo experimental de hipertensión más ampliamente utilizado porque los principios básicos asociados con el comienzo de la hipertensión en estos animales son sorprendentemente similares a los de los humanos (Trippodo y Frohlich, 1981; Zicha y Kunes, 1999). La presión arterial sanguínea de las ratas normalmente se mide utilizando un manguito que se coloca en la cola del animal. Es un método no invasivo originalmente descrito por Bruñag (1973). En muchos estudios, se evalúa el efecto causado tras la

administración oral mediante sonda de una dosis de péptidos y la presión sanguínea de las ratas se mide antes de la administración y después a intervalos de 2 horas durante 8 horas. Finalmente, se vuelve a medir otra vez la presión arterial a las 24 horas de la administración. En estos experimentos se utilizan ratas con unos valores estables de presión arterial y por lo tanto, con edades superiores a 20 semanas.

La actividad antihipertensiva puede también ser evaluada monitorizando a la rata consciente radioteleméricamente (Nurminen et al., 2000; Rousseau-Ralliard et al., 2010). Los transmisores teleméricos son implantados en la aorta abdominal mediante cirugía lo que evita el estrés en el animal.

La hipertensión es una patología crónica que requiere tratamientos largos; así pues, es aconsejable seguir los cambios en la presión arterial de las ratas causados por la ingesta oral a largo plazo de los péptidos en estudio. En estos estudios, los péptidos se administran a través del agua de bebida y la presión arterial se mide a la misma hora todos los días (normalmente por la mañana) para evitar la influencia de los ciclos circadianos. La continuación de las medidas después de la retirada del tratamiento con péptidos permite la evaluación de una posible inversión del efecto. La ingesta de comida, de agua y la ganancia de peso se mide semanalmente durante todo el periodo experimental.

Hay bastantes diferencias entre roedores y humanos en relación a la estructura del intestino, su función y microflora. Ello implica la necesidad de llevar a cabo estudios clínicos en humanos para demostrar la eficiencia de los péptidos antihipertensivos y garantizar su seguridad. Sin embargo, hay muy pocos estudios clínicos realizados en este sentido (Seppo et al., 2003; Aihara et al., 2005; Foltz et al., 2007; Matsui et al., 2002; Usinger et al., 2010; Li et al., 2011). Los resultados de dichos estudios sugieren la posibilidad de utilizar hidrolizados y péptidos procedentes de proteínas de alimentos como ingredientes en alimentos funcionales (preparados nutraceúticos y farmacéuticos) que reducirían el riesgo de hipertensión y por tanto mejorarían la

salud. Esta utilidad sería particularmente indicada en sujetos pre-hipertensos que aun no necesitan medicación antihipertensiva y que pueden controlar su presión arterial a través de la dieta. También podría ser útil en pacientes hipertensos que no han respondido bien a los tratamientos farmacológicos.

Existen ya el mercado algunos de estos péptidos, en los cuales se han realizado pruebas de seguridad y efectividad en pacientes hipertensos (Korhonen y Pihlanto, 2003).

4.2 Estudio de la actividad antioxidante

No se han desarrollado o estandarizado todavía ensayos específicos para medir la capacidad antioxidante de los péptidos. Por lo tanto, los ensayos que comúnmente se utilizan son los desarrollados para otro tipo de compuestos. Son ensayos *in vitro*, basados en reacciones químicas y han servido para cuantificar la efectividad antioxidante del alimento completo, de péptidos parcialmente purificados, y/o péptidos individuales aislados de mezclas alimentarias, con el fin de relacionar dicha actividad con la prevención de procesos oxidativos que ocurren en el cuerpo humano así como en sistemas alimentarios durante su almacenado. Aunque estos ensayos químicos dan idea de la potencial actividad biológica de estos antioxidantes derivados de los alimentos, análisis posteriores tales como investigar la generación de péptidos durante la digestión gastrointestinal, su permeabilidad a través de membranas celulares, así como su estabilidad *in vivo* y reactividad, han de ser llevados a cabo para confirmar su eficacia biológica.

4.2.1 Métodos *in vitro*

Generalmente, el método ideal para la determinación de las propiedades antioxidantes de los péptidos debe determinar su efecto bajo condiciones de reacción que imiten a aquellas que ocurren cuando el estrés oxidativo es inducido *in*

vivo por los RNS (especies de nitrógeno reactivas) y los ROS (especies de oxígeno reactivas) (Magalahaes et al., 2009). Como se ha observado para otros antioxidantes, la actividad de los péptidos depende del ensayo considerado. Las propiedades antioxidantes de los péptidos han sido atribuidas al efecto de cooperación de diferentes propiedades, como son la capacidad para erradicar radicales libres, para actuar como quelantes de iones metálicos, atrapadores de oxígeno o donantes de hidrógeno, y a la posibilidad de prevenir la penetración de iniciadores de oxidación de lípidos formando una membrana alrededor de pequeñas gotas de aceite. De acuerdo a estas propiedades, se han propuesto diversos métodos para medir la actividad antioxidante de los péptidos derivados de alimentos.

En los últimos años, el ensayo para medir la capacidad de absorber el radical oxígeno (ORAC) ha sido muy utilizado para determinar la capacidad antioxidante de péptidos derivados de proteínas del suero de leche, huevo, soja y proteínas de pescado (Contreras et al., 2010; Zhang et al., 2010; Jensen, et al., 2009). En el ensayo básico, los radicales peroxil generados reaccionan con un sustrato de proteína oxidable y fluorescente para formar un producto no fluorescente. La reacción con los radicales peroxil es seguida por una pérdida de la intensidad de fluorescencia con el tiempo. Este ensayo mide la inhibición de la oxidación inducida por el radical peroxil (Ou et al., 2001) en presencia del péptido, que se traducirá en un menor descenso de la fluorescencia. Este ensayo es muy útil para muestras que contienen múltiples ingredientes con actividad antioxidante.

El ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) se ha convertido en uno de los métodos más utilizados a la hora de testar la capacidad antioxidante de péptidos de diferentes fuentes alimentarias. Este método ha sido aplicado a proteínas vegetales, tales como la soja, zeína y proteínas del arroz (Hernández-Ledesma et al., 2010; Tang et al., 2010; Adebisi et al., 2009) y de origen animal, como proteínas de leche o pescado (Hernández-Ledesma et al., 2005; Gómez-Ruiz et al., 2008; Raghavan

et al., 2008). Este ensayo emplea el ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), un sustrato peroxidasa, que cuando se oxida genera un catión radical metaestable (ABTS^{•+}). Este radical se colorea intensamente y puede ser monitorizado espectrofotométricamente en el intervalo de 600-750 nm. La capacidad antioxidante es medida como la capacidad de los compuestos ensayados para disminuir el color reaccionando directamente con el radical ABTS^{•+}. Como patrón se emplea el compuesto denominado Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Roginsky y Lissi, 2005). Este ensayo se utiliza a menudo para estudiar la relación estructura-actividad de los antioxidantes (Arts et al., 2004). El radical ABTS^{•+} puede disolverse tanto en medios orgánicos como acuosos y no se ve afectado por la fuerza iónica, por lo que este ensayo se puede aplicar para la medida de la capacidad antioxidante tanto de compuestos hidrofílicos como lipofílicos (Arnao, 2000). Sin embargo, este método tiene dos limitaciones importantes. Por un lado, el valor TEAC caracteriza la capacidad de la muestra para reaccionar con el radical ABTS^{•+} en lugar de inhibir el proceso oxidativo. Además, el radical ABTS utilizado en el ensayo TEAC tiene una naturaleza diferente a los radicales que se encuentran en los sistemas biológicos (Macdonald-Wicks et al., 2006).

En el ensayo de la actividad secuestradora del radical DPPH el radical cromógeno purpúreo 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) es reducido por compuestos antioxidantes/reductores a hidrazina que es de color amarillo pálido. La habilidad reductora de los antioxidantes puede ser evaluada monitorizando el descenso de absorbancia a 515-528 nm. Este ensayo es técnicamente simple y rápido y sólo requiere de un espectrofotómetro UV-VIS. Muchos autores han utilizado este ensayo para medir la actividad antioxidante de los péptidos originados a partir de proteínas de alimentos (Zhang et al., 2010; Tang et al., 2010; Suetsuna et al., 2000; Li et al., 2008; Chen et al., 2007; Dong et al., 2010; Zhang et al., 2009).

El ensayo del poder reductor de hierro (FRAP) está basado en la reducción de complejo férrico amarillo tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) al complejo ferroso azul (Fe(II)-TPTZ) por la acción de antioxidantes donantes de electrones (Benzie et al., 1999). El color azul resultante, medido espectrofotométricamente a 593 nm, está linealmente relacionado con la capacidad reductora total de los antioxidantes donantes de electrones. Este ensayo es rápido, simple, robusto, económico y no requiere de un equipamiento especializado. Por lo tanto, se ha convertido en uno de los métodos preferidos para determinar la actividad antioxidante de péptidos de diferentes fuentes proteicas de alimentos (Jensen, et al., 2009; Ragahvan et al., 2008; Phanturat, 2010).

En general, la oxidación LDL (lipoproteínas de baja densidad) ha sido utilizada de manera efectiva en estudios *in vitro* para caracterizar la capacidad antioxidante de un gran número de fitoquímicos y péptidos alimentarios (Hu et al., 2000; Katsube et al., 2004; Park et al., 2008; Mamelona et al., 2010). Este método induce artificialmente la autoxidación del ácido linoleico o de partículas LDL. La peroxidación de componentes lipídicos se determina por la formación de dienos conjugados, y su se realiza por espectrofotometría a 234 nm (Handelman et al., 1999). Este ensayo evalúa tres posibles mecanismos de actividad antioxidante: actividad para neutralizar radicales libres, anclarse a lugares críticos en LDL, y quelación de metales (Katsube et al., 2004). Además de los ensayos mencionados, hay otros ensayos químicos que miden la capacidad inhibidora de los ROS, como por ejemplo el método del anión superóxido, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno, entre otros (Huang et al., 2005).

Los antioxidantes de la dieta también pueden actuar como quelantes de iones metálicos, dependiendo de su naturaleza. Las reducciones en la cantidad de oxidación debido a la quelación de iones metálicos de transición por antioxidantes se puede ensayar utilizando un método espectrofotométrico donde en la reacción del antioxidante con una mezcla conteniendo Fe^{2+} libre se puede determinar por la

formación de un complejo coloreado con ferrozina (Decker y Welch, 1990; Sherwin, 1990).

Un compuesto antioxidante puede mostrar resultados diferentes dependiendo del sistema de ensayo utilizado debido a diferencias en el mecanismo de acción del antioxidante o las condiciones de reacción utilizadas. Por eso, normalmente se utiliza más de un ensayo para medir la capacidad antioxidante de un alimento.

4.2.2 Métodos *in vivo*

Una vez que el potencial antioxidante del péptido o péptidos de interés se establece utilizando métodos de análisis *in vitro*, deberían llevarse a cabo estudios con animales y ensayos clínicos con humanos para confirmar la biodisponibilidad y la función biológica deseada. Cualquier información relativa a la bioactividad de una muestra basada únicamente en ensayos *in vitro*, como por ejemplo ORAC, TEAC, FRAP, etc., serían insuficientes para ser extrapolados a su función *in vivo*. Además estos ensayos no evalúan la biodisponibilidad, la estabilidad *in vivo*, la retención del antioxidante en los tejidos y la reactividad *in situ*. En este sentido, varios biomarcadores se usan para medir la habilidad de antioxidantes de la dieta para proteger lípidos, proteínas y ADN de daños oxidativos (Collins, 2005; Griffiths et al., 2002). Los resultados de los ensayos *in vivo* mencionados son una parte esencial para la contar con la aprobación de las agencias federales para que un componente de la dieta pueda ser utilizado en alimentos funcionales y formulaciones nutraceuticas.

4.3 Normativa legal sobre ingredientes y alimentos con efectos beneficiosos para la salud

El Reglamento (EC) N° 1924/2006 armoniza las disposiciones que se refieren a la nutrición y la salud y establece normas que regulan la autorización de la Comunidad en relación a alimentos que pueden mejorar la salud. Según el Reglamento, estos

alimentos deben ser autorizados sólo para su uso en la Comunidad después de una evaluación científica llevada a cabo por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority) (EFSA Journal, 2011).

La EFSA y su panel de productos dietéticos, nutrición y alergias (NDA) publican una guía con fundamento científico del tema aquí expuesto desde el año 2007. Más recientemente, se ha publicado un documento sobre evaluación científica de alimentos que pueden mejorar la salud y que se puede consultar desde abril del 2010 (<http://www.efsa.europa.eu/en/nda/ndaclaims.htm>), seguido de una reunión técnica con expertos de la industria alimentaria, Estados Miembros, EFSA y la Comisión Europea en Parma, en Junio del 2010 (<http://www.efsa.europa.eu/en/ndameetings/docs/nda100601-ax01.pdf>).

De acuerdo con el Reglamento (EC) Nº 1924/2006, un alimento/constituyente que se presenta como beneficioso para la salud, debe demostrar que ejerce un beneficio fisiológico en el organismo. Para ello, el panel NDA de la EFSA emite una opinión si este reclamo es considerado para ejercer un efecto fisiológico beneficioso y se tiene en cuenta el grupo de población hacia el que va dirigido. En base a ello, la Comisión Europea procede a su aprobación o denegación.

5. Bibliografía

Adebiyi, A.P., Adebiyi, A.O., Yamashita, J., Ogawa, T., Muramoto, K. (2009). Purification and characterization of antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolyzates. *European Food Research and Technology*, 228, 553-563.

Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., Nakamura, Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 257-265.

Alaiz, M., Beppu, M., Ohishi, K., Kikugawa, K. (1994). Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation to macrophage scavenger receptor binding. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 15, 51-7.

Alpert, A.J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography*, 499, 177-196.

Arihara, K. (2006) Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.

Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57, 319-324.

Arihara, K., Ohata, M. (2006). Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In *Advanced Technologies for Meat Processing*; Toldrá F., Ed.; Springer: New York, NY, USA, pp. 245-274.

Arihara, K., Ohata, M. (2008). Bioactive compounds in meat. *Meat Biotechnology*, F.Toldrá Ed. pp 231-249. Springer Science and Business Media, LLC.

Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 419-421.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H., Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 45-49.

Astiasaran, I., Cid, C., Melgar, J., Bello, J. (1991). Estudio analítico comparativo de dos tipos de jamones curados: de cerdo ibérico y de cerdo blanco. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 37-45.

Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R.P., Ageyeva, E.A., Zheltukhina, G.A. (1994). L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carcinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochemical Journal*, 304, 509-516.

Bailey, C.A., Bryla, P., Malick, A.W. (1996). The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advance Drug Delivery Reviews*, 22, 85-103.

- Benzie, I.F.F., Chung, W.Y., Strain, J.J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 146-150.
- Berot, S., Popineau, Y., Compoin, J. P., Blassel, C., and Chaufer, B. (2001). Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Application*, 753, 29-35.
- Boffetta, P., Nyberg, F. (2003). Contribution of environmental factors to cancer risk. *British Medical Bulletin*, 68, 71-94.
- Broncano, J.M., Otte, J., Petrón, M.J., Parra, V., Timón, M.L. (2011). Isolation and identification of low molecular weight antioxidant compounds from fermented "chorizo" sausages. *Meat Science*, 90, 494-501.
- Brown, N.J., Vaughan, D.E. (1998). Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, 97, 1411-1420.
- Bruna, J.M., Fernández, M., Hierro, E.M., Ordóñez, J.A., y de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54, 135-145.
- Bruñag, R.D. (1973). Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology*, 34, 279-282.
- Burns, B.G. & Ke, P.J. (1985). Liquid chromatography determination of hypoxanthine content in fish tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68, 444-448.
- Buscailhon, S., Berdague, J.L., & Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of french dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 69-75.
- Cambero, M.I., Seuss, I., Honikel, K.O. (1992). Flavor compounds of beef broth as affected by cooking temperature. *Journal of Food Science*, 57, 1285-1290.
- Cheang, B. and Zydney, L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*. **231**: 159-167.
- Chen, G.T., Zhao, L., Zhao, L.Y., Cong, T., Bao, S.F. (2007). In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of Science Food and Agriculture*, 87, 357-362.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2619-23.

- Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D., Li-Chan, E.C.Y. (2007). Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 410-419.
- Colilla, F.J., Yadav, S.P., Brew, K., Mendez, E. (1991). Peptide maps at picomolar levels obtained by reversed-phase high-performance liquid-chromatography and precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate -Microsequencing of phenylthiocarbamyl peptides. *Journal of Chromatography*, 548, 303-310.
- Collins, A.R. (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *American Journal of clinical Nutrition*, 81, 261S-227S.
- Contreras, M.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J., Recio, I. (2010). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science Technology*, 44, 9-15.
- Cremer, D.R. & Eichner, K. (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*, 71, 37-43.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648.
- de Boer, A.R., Letzel, T., van Elswijk, D.A., Lingeman, H., Niessen W.M.A, Irth, H. (2004). On-line coupling of high-performance liquid chromatography to a continuous-flow enzyme assay based on electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76, 3155-3161.
- Deak, S.T., Csàky, T.Z. (1984). Factors regulating the exchange of nutrients and drugs between lymph and blood in the small intestine. *Microcirculation, Endothelium and Lymphatics*, 1, 569-88.
- Decker, E.A., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 674-7.
- Dong, X.P., Zhu, B.W., Zhao, H.X., Zhou, D.Y., Wu, H.T., Jang, J.F, Li, D.M., Murata, Y. (2010). Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 975-984.
- Dransfield, E., Etherington, D. (1981). Enzymes in the tenderization of meat. In G. G. Birch, N. Blakebrough, y K. J. Parker (Eds.), *Enzymes and food processing* (pp. 177-194). London: Applied Science Publishers.
- Dunnett, M., Harris, R.C. (1997). High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *Journal of Chromatography B*, 688, 47-55.
- Erdman, K., Cheung, B.W.Y., Schroder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 19, 643-654.

- Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., Schroder, H. (2006). The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *Journal of Nutrition*, 136, 2148-52.
- Escudero, E., Sentandreu, M.A., Arihara, K., Toldrá, F. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2895-2901.
- Escudero, E., Toldrá, F., Sentandreu, M.A., Nishimura, H., Arihara, K. (2012). Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat. *Meat Science*, 91, 382-384.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2003). Are antioxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Diabetes*, 52, 1-8.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jaraca venom. *Biochemistry*, 9, 2583-2593.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, S33-7.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, G.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134, 980-988.
- Flores, J., Bermell, S., Nieto, P., Costell, E. (1984). Cambios bioquímicos en las proteínas del jamón durante los procesos de curado lento y rápido, y su relación con la calidad. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, 24, 503-509.
- Flores, J., Marcus, J.R., Nieto, P., Navarro, J.L. & Lorenzo, P. 1997. Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*. 204, 168-172.
- Flores, M., Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (1996). HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2578-2583.
- Flores, M., Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (1998). Feedback inhibition of porcine muscle alanyl and arginyl aminopeptidases in cured meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4982-4986.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 191-200.
- Folkow, B., Johansson, B., Mellander, S. (1961). The comparative effects of angiotensin and noradrenaline on consecutive vascular sections. *Acta Physiologica Scandinavica*, 53, 99-104.
- Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P.C., Ducahteau, G.S.M.J.E., 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.

Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T., Kloek, J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *The Journal of Nutrition*, 137, 953-958.

Fraterman, S., Zeiger, U., Khurana, T.S., Rubinstein, N.A, Wilm, M. (2007). Combination of peptide OFFGEL fractionation and label-free quantitation facilitated proteomics profiling of extraocular muscle. *Proteomics*, 7, 3404-3416.

Fujita, H., Yokohama, K., Yasumoto, R., Yoshikawa, M. (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22, S304-S305.

Fujita, H., Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44, 123-127.

García, C., Berdagué, J.L., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J & Ventanas, J. 1991. Volatile compounds of dry-cured iberian ham. *Food Chemistry*, 41, 23-32.

Gardner, M.L.G. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual Review of Nutrition*, 8, 329-350.

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

Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227, 1061-1067.

Greaser, M.L. (1986). Conversion of muscle to meat. In *Muscle as food* (Ed P.J. Bechtel), pp.37-101. Orlando: Academic Press.

Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., et al. (2002). Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 101-208.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*, 344, 721-4.

Hammes, W.P., Haller, D., Gänzle, M.G. (2003). Fermented meat. In E.R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods* (pp. 251-275). Boca Raton, FL: CRC Press.

Handelman, G.J., Cao, G., Walter, M.F., Nightingale, Z.D., Paul, G.L., Prior, R.L., Blumberg, J.B. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts.1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4888-4893.

- Hansen-Möller, J., Hinrichsen, L., & Jacobsen, T. (1997). Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3123-3128.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11, 298-300.
- Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K.A., Kumagai, H., Feng, Y., Takahashi, K. (1998). Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2167-70.
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptides functions. *Journal of Biotechnology*, 2, 435-449.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4658-4667.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-Lactalbumin and beta-Lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., de Lumen, B.O. (2010). Antioxidant and antiinflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186, 127-134.
- Hu, C., Zhang, Y., Kitts, D.D. (2000). Evaluation of antioxidant and prooxidant activity of bamboo *Phyllostachys nigra* var. henonis leaf extract in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3170-3176.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-56.
- Hughes, M.C., Kerry, J.P., Arendt, E.K., Kenneally, P.M., McSweeney, P.L.H., O'Neill, E.E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science*, 62, 205-216.
- Iroyukifujita, H., Eiichiyokoyama, K., 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.
- Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15, 109-50.
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D.L. (1996). Lipid oxidation in biological and food systems. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., editors. *Food Antioxidants*. New York: Dekker, pp. 5-63.
- Jang, A., Jo, C., Kang, K.S., Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107, 327-336.

- Jang, A., Lee, M. (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69, 653-661.
- Jang, A., Cho, Y.J., Lee, J.I., Shin, J.H., Kim, I.S., Lee, M. (2004). The effect of beef peptide on blood pressure and serum lipid concentration of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Journal of Animal Science and Technology*, 46, 107-114.
- Jauhainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., 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.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840-846.
- Jensen, J.J., Abrahamsen, H., Maehre, H.K., Elveoll, E.O. (2009). Changes in antioxidative capacity of saithe (*Pollachius virens*) and shrimp (*Pandalus borealis*) during in vitro digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10928-10932.
- Jia, X.H., Hildrum, K.I., Westad, F., Kummen, E., Aass, L., Hollung, K. (2006). Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in Longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5, 1763-1769.
- Jiménez-Colmenero, J., Ventanas, J. y Toldrá, F. (2010). Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*, 84, 585-593.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J., Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4, 5.
- Katayama, K., Angraeni, H.E., Mori, T., Ahhmed, A.A., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakayama, T., Maruyama, M., Muguruma, M. (2008). Porcine skeletal muscle troponin is a good source of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity and anti hypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 355-360.
- Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawahara, Y. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 16, 417-424.
- Katayama, K., Mori, T., Kawahara, S., Miake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, T., Maruyama, M., Muguruma, M. (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine skeletal muscle myosin and its antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science*, 72, S702-S706.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Animal Science Journal*, 74, 53-58.

- Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Kodama, Y., Kawamura, Y., Muguruma, M. (2004). Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 771-775.
- Katsube, N., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2391-2396.
- Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J., Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2992-2997.
- Kim, E.K., Lee, S.J., Jeon, B.T., Moon, S.H., Kim, B., Park, T.K., Han, J.S., Park, P.J. (2009). Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*, 114, 1365-1370.
- Kjaersgard, I.V.H., Jessen, F. (2003). Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3985-3991.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides. Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H.J., Roepstorff, P. y Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6992-6997.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
- Lee, H.J. (2002). Protein drug oral delivery: the recent progress. *Archives of Pharmacal Research*, 25, 572-84.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B.P., Wu, Y.N. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102, 1135-1143.
- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., 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.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C., Adebisi, A., Tappia, P., Aukema, H., Jones, P., Aluko, R. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9854-9860.

- Li, X.X., Han, L.J., Chen, L.J. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of Science Food and Agriculture*, 1660-6.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L., Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118, 403-410.
- Liu, Y., Xu, X.L., Zhou, G.H. (2007). Changes in taste compounds of duck during processing. *Food Chemistry*, 102, 22-26.
- López-Fandino, R., Otte, J., 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.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
- Magalhaes, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77, 1559-1566.
- Mamelona, J., Saint-Louis, R., Pelletier, E. (2010). Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates from echinoderm by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 147-154.
- Marcuse, R. Antioxidative effect of aminoacids. *Nature*, 1960, 186, 886-7.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24-38.
- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Itez-Donoso, R., Cordoba, J.J. (2001). Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. *Meat Science*, 59, 363-368.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of s1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.
- Matsui, T., Matsumoto, K., Mahmud, T.H.K., Arjumand, A. (2006). Antihypertensive peptides from natural resources. In *Advances in Phytomedicine*; Elsevier: Oxford, UK, Volume 2, pp.255-271.
- Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K., 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.
- Michaelidou, A., Katsiari, M.C., Kondyli, E., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. (2003). Effect of a comercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Dairy Journal*, 13, 179-189.
- Miguel, M., Contreras M.M., Recio, I., Aleixandre, A. (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein derived peptides. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1-6.

- Miguel, M., Contreras, M.M., Recio, I., Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 112, 211-214.
- Miguel, M., Lopez-Fandiño, R., Ramos, M., Aleixandre, M.A. (2006). Long-term antihypertensive effect of egg white treated with pepsin in hypertensive rats. *Life Science*, 78, 2960-2966.
- Miguel, M., Muguerza, B., Sánchez, E., Delgado, M.A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M.A. (2005). Changes in arterial blood pressure of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728 in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 93, 1-9.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M.. Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in spanish dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009; 57: 8982-88.
- Mora, L., Sentandreu, M.A. & Toldrá F. (2010). Identification of small troponin T peptides generated in dry-cured ham. *Food Chemistry*, 123, 691-697.
- Mora, L., Sentandreu, M.A., Koistinen, K.M., Fraser, P.D., Toldrá, F., Bramley, P.M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3228-3234.
- Mora, L., Sentandreu, M.A., Toldrá, F. (2008). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science*, 79, 709-715.
- Motilva, M.J., Toldrá, F., Nieto, P., & Flores, J. (1993). Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 48, 121-125.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A., Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milks fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.
- Muguruma, M., Ahmed, A.M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T. (2009). Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects in vivo. *Food Chemistry*, 114, 516-522.
- Muller, A., Daufin, G., and Chaufer, B. (1999). Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science*, 153: 9–21.
- Murray, B.A., Walsh, D.J., FitzGerald, R.J. (2004). Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59, 127-137.
- Nagaraj, N.S., Anilakumar, K.R. y Santhanam, K. (2005). Postmortem changes in myofibrillar proteins of goat skeletal muscles. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 152-170.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T., Okubo, A., Yamazaki, S. (1995). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.

- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K.Y., 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.
- Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Mio, H., Ishikawa, S., Itoh, M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science*, 67, 434-437.
- Nieto, P. (1988). Aportaciones a la tecnología del jamón curado: cambios físicos, químicos y sensoriales durante los procesos de curado lento y rápido. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Valencia.
- Nishimura, T., Rhue, M.R., Okitani, A., Kato, H. (1988). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 2323-2330.
- Nurminen, N.L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonne, H., Vapaatalo, H. (2000). A-lactrophin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66, 1535-1543.
- Okamoto, K., Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27, 282-293.
- Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196, 444-444.
- Ou, B., Woodill-Hampsch, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Palmia, F., Mazoyer, C., Diaferia, C., Baldini, P., Porretta, A. (1992). Salt and water distribution in typical italian hams. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32, 71-83.
- Palmieri, V.O., Grattagliano, I., Portincasa, P., Palasciano, G. (2006). Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, 2006, 136, 3022-6.
- Pappenheimer, J.R., Volpp, K. (1992). Transmucosal impedance of small intestine-correlation with transport of sugars and aminoacids. *American Journal of Physiology*, 263, C480-93.
- Park, E.Y., Morimae, M., Matsumura, Y., Nakamura, Y., Sato, K. (2008). Antioxidant activity of some protein hydrolysates and their fractions with different isoelectric points. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9246-9251.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatine hydrolysate with antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*, 43, 86-97.

- Pihlanto, A., Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175-276.
- Pizzano, R., Nicolai, M.A., Addeo, F. (1998). Antipeptide antibodies as analytical tools to discriminate among bovine alpha(s1)-casein components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 766-771.
- Qian, Z.-J., Je, J.-Y., Kim, S.-K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8398-8403.
- Qian, Z.J., Jung, W.K., Kim, S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690-8.
- Quian, Z.J., Jung, W.K., Lee, S.H., Byun, H.G., Kim, S.K. (2007). Antihypertensive effect of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) muscle protein in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochemistry*, 42, 1443-1448.
- Raghavan, S., Kristinsson, H.G., Leeuweburgh. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10359-10367.
- Rajakpase, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., Kim, S.K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-82.
- Rautenbach, R. and Gröschl, A. (1990). Separation potential of nanofiltration membranes. *Desalination* 77, 73-84.
- Recio, I., Floris, R., Visser, S. (2000). Bioactive peptides from food proteins: A new isolation method. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 11, 9-11.
- Rho, S.J., Lee, J.S., Chung, Y.I., Kim, Y.W., Lee, H.G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44, 490-493.
- Rice-Evans, C.A, Diplock, A.T. (1992). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15, 77-9.
- Rico, E., Toldrá, F. y Flores, J. (1991). Assay of cathepsin-D activity in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Meat Science*, 29, 287-293.
- Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-7.
- Roberts, P.R., Zaloga, Z.P. (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, 2, 237-43.
- Rodríguez-Núñez, E., Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 53, 187-190.

Rodríguez-Nuñez, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 53, 187-190.

Roginsky, V., Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.

Rousseau-Ralliard, D., Goriand, F., Tardivel, S., Lucas, A., Algaron, F., Mollé, D., Robert, V., Auchère, D., Boudier, J.F., Gaillard, J.L., Monnet, V., Tauzin, J., Grynberg, A. (2010). Inhibitory effect of as1-and as2-casein hydrolysates on angiotensin I-converting enzyme in human endothelial cells in vitro, rat aortic tissue ex vivo, and renovascular hypertensive rats in vivo. *Journal of Dairy Science*, 93, 2906-2921.

Rubas, W., Grass, G.M. (1991). Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 7, 15-69.

Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R., Nishimura, T. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1741-1745.

Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3661-3667.

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

Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3668-74.

Sayas-Barberá, M.E. y Perez, J.A. (1989). Aportaciones al proceso tecnológico de elaboración de jamón curado: evaluación de los procesos fisicoquímicos y estructurales durante el proceso de postsalado. Tesis grado Máster. Universidad Politécnica de Valencia.

Schägger, H. (2006). Tricine-Sds-Page. *Nature Protocols*, 1, 16-22.

Sentandreu, M. A, Aristoy, M. C., Toldrá, F., Stoeva, S., Laib, K. & Voelter, W. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 2003; 68: 64-69.

Selvam, R. y Devaraj, S. (1996). Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 33, 62-5.

Sentandreu, M.A., Armenteros, M., Calvete, J.J., Ouali, Aristoy, M.C. & Toldrá, F. (2007). Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3613-3619.

Sentandreu, M.A., Coulis, G. y Ouli, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 400-421.

- Sentandreu, M.A., Stoeva, S., Aristoy, M.C., Laib, K., Voelter, W., Toldrá, F. (2003). Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 68, 64-69.
- Sentandreu, M.A., Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 9, 546-554.
- Sentandreu, M.A., Toldrá, F. (2007). Oligopeptides hydrolysed by muscle dipeptidyl peptidases can generate angiotensin-I converting enzyme inhibitory dipeptides. *European Food Research and Technology*, 224, 785-790.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 326-330.
- Sforza, S., Galaverna, G., Schivazappa, C., Marchelli, R., Dossena, A., Virgili, R. (2006). Effect of extended aging of parma dry-cured ham on the content of oligopeptides and free amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9422-9429.
- Sforza, S., Pigazzani, A., Motti, M., Porta, C., Virgili, R., Galaverna, G., Dossena, A. & Marchelli, R. Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity. *Food Chemistry*, 2001; 75: 267-73.
- Sherwin, E.R. (1990). Antioxidant. In: Branan AL, Davidson P.M. Salminen, S, editors. Food additives. New York, USA: Marcel Dekker; 1990. p. 139-93.
- Shahidi, F., Rubin, L.J. & D'Souza, L.A. (1986). Meat Flavor Volatiles : A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 141-243.
- Siemerink, M., Shebb, N.H., Liesener, A., Perchuc, A.M., Shöni, R., Wilmer, M., Hayen, H., Karst, U., Vogel, M. (2010). Development of a fast liquid chromatography/mass spectrometry screening method for angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in complex natural mixtures like snake venom. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 24, 687-697.
- Simpson, R.J. (2006). Electrophoresis of peptides (Tricine-SDS-PAGE). CHS Protocols, doi: 10.1101/pdb.prot 4314.
- Spanier, A.M., Edwards, J.V., Dupuy, H.P. (1988). The warmed-over flavor process in beef -A study of meat proteins and peptides. *Food Technology*, 42, 110.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities of peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128-131.
- Suetsuna, K. y Chen, J.R. (2002). Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten. *Food Science and Technology*, 8, 227-30.

- Sun, H., Liu, D., Li, S., Qin, Z. (2009). Transepithelial transport characteristics of the antihypertensive peptide, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 293-298.
- Surette, M.E., Gill, T.A., & Leblanc, P.J. 1988. Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod *Gadus morhua* and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 19-22.
- Takano, T. (1998). Milk derived peptides and hypertension reduction. *International Dairy Journal*, 8, 375-381.
- Tang, X.Y., He, Z.Y., Dai, Y.F., Xiong, Y.L.L., Xie, M.Y., Chen, J. (2010). Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 587-593.
- Toldrá, F. (2004). Dry. In W.K. Jensen, C. Devine, & M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences* (pp. 360-365). Oxford: Elsevier.
- Toldrá, F. y Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 331-352.
- Toldrá, F., Aristoy, M.C., Part, C., Cervero, C., Rico, E., Motilva, M.J., & Flores, J. (1992). Muscle and adipose-tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 816.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59, 523-530.
- Toldrá, F., Rico, E. y Flores, J. (1993). Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 157-161.
- Trippodo, N.C., Frohlich, E.D. (1981) Similarities of genetic (spontaneous) hypertension in man and rat. *Circulation Research*, 48, 309-319.
- Usinger, L., Jensen, L.T., Flambard, B., Linneberg, A., Ibsen, H. (2010). The antihypertensive effect of fermented milk in individuals with prehypertension or borderline hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 24, 678-683.
- Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M.A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, 57, 813-815.
- Vercruyse, L., Van Camp, J., Smaghe, 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., Camp, J.V., Verstraete, W. (2002). 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., Camp, J.V., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Vermeirssen, V., Camp, J.V., Verstraete, W. (2007). Bioavailability of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noel, J., Fleurence, J. (2001). Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two- dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1539-1544.

Wang, D., Wang, L.J., Zhu, F.X, Zhu, J.Y., Chen, X.D., Zou, L. (2008). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, 107, 1421-8.

Wang, W.Y., De Mejía, E.G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78.

Wijesekara, I., Kim, S.K. (2010). Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry. *Marine Drugs*, 8, 1080-1093.

Wu, H.C., Pan, B.S., Chang, C.L., Shiao, C.Y. (2005). Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 176-183.

Wu, J., Aluko, R.E., Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatographic assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography*, 950, 125-130.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X., Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111, 370-6.

Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt like product fermented by *Lactobacillus helveticus* ceN4. *Journal of Dairy Science*, 82, 1388-93.

Yokohama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 1541-1545.

Yoshida, K., Sorimachi, Y., Fujiwara, M., Hironaka, K. (1995). Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion. *Japanese Circulation Journal-English Edition*, 59, 40-48.

Yoshida, T. (2004). Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60, 265-280.

Youn, Y.K., Lalonde, C., Demling, R. (1992). Oxidants and the pathophysiology of burn and smoke inhalation injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 12, 409-15.

Zhang, L., Li, J.R., Zhou, K.Q. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolyzates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, 101, 2084-2089.

Zhang, S.B., Wang, Z., Xu, S.Y., Gao, X.F. (2009). Purification and characterization of a radical scavenging peptide from rapeseed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 86, 959-966.

Zicha, J., Kunes, J. (1999). Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiological Reviews*, 79, 1227-1282.

Ziv, E., Bendayan, M. (2000). Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microscopy Research and Technique*, 49, 346-52.

II. Objetivos

II. Objetivos

La actividad proteolítica que tiene lugar durante el proceso de elaboración del jamón curado genera una gran cantidad de péptidos y aminoácidos libres como consecuencia de la actividad de enzimas musculares de tipo endo y exopeptidasa. El estudio de péptidos resultantes de dicha proteólisis durante el curado del jamón con determinado tipo de actividad biológica y que pueden ejercer un efecto positivo en la salud del consumidor es el principal objetivo de esta tesis.

Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Determinación de las actividades antihipertensiva y antioxidante de fracciones peptídicas solubles aisladas de jamón curado y verificación *in vivo* de la actividad antihipertensiva.
- Purificación y caracterización de los péptidos presentes en las fracciones peptídicas que muestren actividad antihipertensiva y antioxidante.
- Identificación de péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I y antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas.
- Identificación de péptidos con actividad antioxidante.

III. Resultados

Capítulo 1
Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions
extracted from Spanish dry-cured ham
Meat Science 2012, 91, 306-311

Antihypertensive Effect and Antioxidant Activity of Peptide Fractions Extracted from Spanish Dry-cured Ham

Elizabeth Escudero^{1,2}, Maria-Concepcion Aristoy¹, Hitoshi Nishimura²,
Keizo Arihara^{2✉} and Fidel Toldrá¹

1. Instituto de agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avd. Agustín Escandino, 7 46980, Paterna,, Valencia, Spain

2. Faculty of Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada-shi 0348628, Japan

Received 14 November 2011, Received in revised form 5 February 2012, Accepted 7 February 2012

Abstract

This study examined the antihypertensive and antioxidant activity of water soluble fractions of a Spanish dry-cured ham extract. Antihypertensive activity of fractionated peptide extract was determined by measuring changes in systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats after oral administration of fractionated extract. Every sample exhibited antihypertensive activity, being pooled fractions corresponding to an eluted volume from 200 mL to 450 mL (Mr. 1700 Da or lower) the most antihypertensive with a decrease of 38.38 mmHg in systolic blood pressure. *In vitro* experiments revealed marked in vitro angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in collected fractions corresponding to these elution volumes. On the other hand, fractionated peptide extract was studied and some of the collected fractions exhibited great 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity with values ranging from 39% to 92% as well as superoxide ion extinguishing ability with values ranging from 41.67% to 50.27% of antioxidant activity, thus suggesting the presence of peptides with antioxidant activity. These findings suggest that Spanish dry-cured ham contains relevant peptides that exhibit antioxidant and antihypertensive activities.

Keywords: Dry-cured ham, antioxidant, antihypertensive, bioactive peptide.

INTRODUCTION

Different kind of cured products are produced in Spain, representing an important part of total processed meat products. The most important product is dry-cured ham, being very popular and with strong presence in the Spanish markets. Many biochemical pathways take place during the processing of Spanish dry-cured ham, leading to the unique characteristics of the product. An intense proteolysis by endogenous muscle enzymes has been reported for sarcoplasmic and myofibrillar proteins (Bellatti, Dazzi, Chizzolini, Palmia & Parolari, 1985; Toldrá, Rico & Flores, 1993; Toldrá & Flores, 1998; Toldrá, 1998). The result is an important accumulation of peptides of different size (mainly small peptides) (Mora, Sentandreu, Koistinen, Fraser, Toldrá & Bramley, 2009; Mora, Sentandreu, Fraser, Toldrá & Bramley, 2009; Sentandreu, Aristoy, Toldrá, Stoeva, Laib & Voelter, 2003) and free aminoacids at the end of dry-curing (Sforza, Pigazzani, Motti, Porta, Virgili, Galaverna, Dossena & Marchelli, 2001; Toldrá, Aristoy & Flores, 2000), being these products of great importance for its direct or indirect contribution to flavor and final quality of the product.

Apart from taste or flavor characteristics, little is known about the effect that the generated peptides might exert on human health. Peptides can regulate different processes in the organism having a positive impact on body functions that may ultimately influence health (Kitt's & Weiler, 2003). Biologically active peptides have been isolated from many food products including milk, soy and egg protein (Pihlanto & Korhonen, 2003). Different health effects have been attributed to food-derived peptides which include antimicrobial properties, blood pressure lowering (ACE inhibitory) effect, cholesterol lowering ability, antithrombotic and antioxidative effects, enhancement of mineral absorption, immunomodulatory effect and opioid activities (Hartman & Meisel, 2007). These bioactive peptides

are inactive within the sequence of parent proteins but can be released during enzymatic hydrolysis of the proteins and exert biological activity (Korhonen, 2009). The most studied peptides are angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides.

ACE plays an important role in the regulation of blood pressure, since ACE converts an inactive angiotensin-I to angiotensin-II which is a potent vasoconstrictor thus leading to an increase in blood pressure. For that reason, substances inhibiting ACE activity would be able to reduce the systolic blood pressure (Houston, 2002). ACE-inhibitory peptides derived from the hydrolysis of pork meat proteins (Arihara, Nakashima, Mukai, Ishikawa & Itoh, 2001; Katayama, Tomatsu, Fuchu, Sugiyama, Kawahara, Yamauchi, Kawamura & Muguruma, 2003) or derived from *in vitro* digestion of pork meat (Escudero, Sentandreu, Arihara & Toldrá, 2010) have been reported. Also, ACE-inhibitory activities in extracts of dry-cured ham have been studied (Arihara & Ohata, 2008). Moreover, several dipeptides derived from the action of muscle dipeptidylpeptidases during the dry-curing process of Spanish dry-cured ham have been found to inhibit ACE in some cases even more than 90% of its activity (Sentandreu & Toldrá, 2007a). However, there is no information about *in vivo* antihypertensive properties of peptide extracts from dry-cured ham.

On the other hand, antioxidant activity deficiency has also been involved in the occurrence of hypertension and other diseases such as cancer, diabetes, neurodegenerative disorders and aging (Ames, Shinegaga & Hagen, 1993). Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide and hydroxyl radicals (-OH) are physiological metabolites derived from respiration in aerobic organisms. Uncontrolled generated ROS are very unstable, and react rapidly with other substances including DNA, membrane lipids and proteins (Jae-Young, Pyo Pam, Eun-Kyung, & Chang-Bum, 2009), thus leading to

the mentioned diseases. So, researchers investigate natural antioxidants in food that may protect the body against free radicals and retard the evolution of many chronic diseases (Liu, Chen & Lin, 2005).

In this context, protein hydrolysates from different sources haven been reported to posses antioxidant activity (Sakanaka, Tachibana, Ishihara & Juneja, 2004; Torruco-Uco, Chel-Guerrero, Martínez-Ayala, Davila-Ortiz & Betancur-Ancona, 2009). Moreover, many peptides with antioxidant activity generated from the hydrolysis of various proteins have been reported, such as sunflower proteins (Ren, Zheng, Liu & Liu, 2010), soy protein (Chen, Muramoto & Yamauchi, 1995) and alfalfa leaf protein (Xie, Huang, Xu & Jin, 2008). However, there is little information about antioxidant peptides generated in meat products including dry-cured ham.

In the present study, we investigated Spanish dry-cured ham as a natural source of antihypertensive peptides by measuring *in vitro* ACE inhibitory activity and changes in systolic blood pressure (SBP) in spontaneously hypertensive rats (SHR) after oral administration of peptide fractions extracted from dry-cured ham. On the other hand, we also studied the antioxidant activity by DPPH radical-scavenging activity and superoxide ion extinguishing ability of the peptide fractions. The study on Spanish dry-cured ham as a natural source of antihypertensive and antioxidant peptides is a very interesting subject because these peptides could help to counteract the adverse action of NaCl typical of this product, helping to maintain an adequate blood pressure and good health condition.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Chemicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and xanthine oxidase from bovine milk were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 2-methyl-6-p-

methoxy phenyl ethynyl-imidazopyridine (MPEC) was purchased from ATTO Corp. (Tokyo, Japan). Hypoxanthine was purchased from Wako Chem. Industries Ltd. (Osaka, Japan). Angiotensin-converting enzyme (from rabbit lung) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A). Abz-Gly-*p*-nitro-phe-pro-OH trifluoroacetate salt was obtained from Bachem AG. (Bubendorf, Switzerland). Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Spanish dry-cured ham preparation

Three Spanish dry-cured ham were produced using raw material from 6-months old pig (Landrace x Large White). Hams were bled and prepared according to traditional procedures consisting of the pre-salting stage, for potassium nitrate incorporation, the salting stage, where hams were completely covered with solid salt and placed in a cold room (1-3 °C and 80-90% relative humidity), post-salting, where salted hams were kept at low temperatures (3-5 °C) and with relative humidities in the range of 75-85% for 60 days and finally, the ripening-drying at temperatures 14-20 °C and lower relative humidity (until 70%). The total length of the curing process was 11 months.

Extraction and deproteinization

50 g of *Biceps femoris* muscle from the processed Spanish dry-cured hams were minced and homogenized with 200 mL of 0.01N HCl in a stomacher (IUL Instrument, Barcelona, Spain) for 8 min. The homogenate was centrifuged in the cold (12000 *g* for 20 min at 4°C) and, after filtering through glass wool, the supernatant was deproteinised by adding 3 volumes of ethanol and maintaining the sample 20 min at 4°C. After that, the sample was centrifuged again (12000 *g* for 20 min at 4°C) and the supernatant was dried in a rotary evaporator. The dried deproteinised extract was dissolved in 25 mL of 0.01 N HCl, filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20°C until use.

Size-exclusion chromatography

5 mL aliquot of each deproteinised extract from three different Spanish dry-cured ham extract were subjected to size-exclusion chromatography in order to fractionate the peptides according to their molecular mass. For this purpose, a Sephadex G25 column (2.5 x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 0.01 N HCl, was employed. The separation was performed at 4°C using 0.01 N HCl as eluent, at a flow rate of 15 mL/h. The first 195 mL were discarded, and then 5mL fractions were collected using an automatic fraction collector and further monitored by ultraviolet (UV) absorption at 214 nm (Agilent 8453 UV spectrophotometer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Fractions eluting from 200 mL to 450 mL (fractions 40 to 90) and fractions eluting from 505 to 625 mL (fractions 101 to 125) were collected and lyophilised. Then each fraction was redissolved in 2 mL distilled water and an aliquote of 0.5 mL of each fraction was separated and stored at -20°C until use for ACE inhibitory activity and antioxidant activity assay.

For antihypertensive in vivo assay, fractions corresponding to an elution volume from 200 mL to 320 mL and containing the remaining volume of 1.5 mL each were pooled (sample 1). The same procedure was followed for fractions corresponding to an elution volume from 325 mL to 450 mL (sample 2) and fractions corresponding to an elution volume from 505 mL to 625 mL (sample 3). Then, samples 1, 2 and 3 were submitted to solid phase extraction using an Oasis® HLB cartridge (35 cc, Waters, Ireland) in which respective peptides were retained and then eluted with 50% methanol. Eluate was lyophilised, constituting the starting material for the antihypertensive activity assay.

Assay of ACE Inhibitory Activity

The ACE inhibitory activity of the collected fractions from three different hams samples was measured according to the method developed by Sentandreu and

Toldrá (2006). This assay is based on the ability of ACE to hydrolyze the internally quenched fluorescent substrate *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-*L*-phenylalanyl-*L*-proline (Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro). A sample solution (50 µL each collected fraction) was mixed with 50 µL of 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3) containing 3 mU/mL of ACE, then preincubating the mixture for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of 200 µL of 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3) containing 1.125 M NaCl and 10 mM Abz-Gly-Phe- (NO₂)-Pro, which was preincubated 10 min at 37°C. The reaction mixture was then incubated for 45 min at 37°C. The generation of fluorescence due to the release of *o*-aminobenzoylglycine (Abz-gly) by the action of ACE was measured using excitation and emission wavelengths of 355 and 405 nm, respectively. ACE inhibition of each collected fraction is expressed as percentage.

Antihypertensive activity

Animal preparation

Eight male spontaneously hypertensive rats (SHR), 10 week old, were purchased from Charles River Japan Inc. (Yokohama, Japan). The SHR were housed in cages in a controlled environment (12h light-dark cycle and temperature and humidity of 24°C and 50 to 60%, respectively). The SHR were fed with a standard laboratory diet (CE-2; Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan), and tap water was freely available.

Dosing of the animal

Single oral administration of the lyophilised samples 1, 2 and 3 dissolved in distilled water at a concentration of 0.834 mg/mL sample 1, 0.27 mg/mL sample 2 and 1.59 mg/mL sample 3 were performed using SHR of 15 to 28 week old (330 to 395 g in body weight). The systolic blood pressure (SBP) of SHR was 210 mmHg or higher. Oral administration was performed as follows: each sample was suspended in distilled water and adjusted to 4.56 mg of sample 1/ kg of body

weight (B.W), 1.48 mg of sample 2/ kg B.W and 8.7 mg of sample 3/ kg B.W and control (distilled water) . The peptide solution and control were administered to the rats by gastric intubation with a metal tube (Natsume Seisakusho Co., Tokyo, Japan).

Blood pressure measurement

The SBP was measured by the tail cuff method with a programmed electrospgymomanometer (BP-98; Softron Co., Tokyo, Japan), after warming the rat in a thermostated box at 40°C for 15 min. The antihypertensive activity of the samples and control was evaluated by measuring the change of SBP at 0, 2, 4, 6, 8 and 24h after single oral administration of each sample and control. Results are expressed as the mean value of systolic blood pressure of 8 SHR at each time and significant difference from control was evaluated. Every time the measurements were made in triplicate and the average values were reported.

Statistical analysis

Change in SBP was expressed as the difference in SBPs before and after administration.

Data are expressed as means and standard errors. Independent samples Student's *T*-Test was used for statistical analysis (Daniel, 1987).

Antioxidant activity

DPPH radical-scavenging assay

The DPPH radical-scavenging activity of the collected fractions was determined as described by Bersuder, Hole and Smith (1998). 500 µL of each peptide fraction were mixed with 500 µL of ethanol and 125 µL of a DPPH solution (0.02% in ethanol). The mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature, and the reduction of DPPH radicals was measured at 517 nm. In its radical form, DPPH has an absorption band at 517 nm which disappears upon reduction by an antiradical compound. Lower absorbance of the reaction mixture

indicated higher free radical-scavenging activity. DPPH radical-scavenging activity was calculated as: $\text{DPPH radical-scavenging activity (\%)} = (\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}) / \text{Absorbance control} \times 100$. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The test was carried out in triplicate.

Superoxide ion extinguishing ability

The superoxide ion extinguishing ability using a hypoxanthine-xanthine oxidase system as the source of superoxide ion was assayed in the same tested fractions for DPPH radical-scavenging assay. Measurement was carried out using a method developed by Shimomura, Wu, Murai & Nakamura (1998) with some changes. Thus, 240 μL of a working solution composed of 100 mM potassium biphosphate buffer containing 0.05 mM EDTA, at pH 7.5 ; a xanthine oxidase solution (0.1 unit/mL) and the luminiscent reagent MPEC (5 mg in 59.7 mL bi-distilled water) in the proportion 170:60:10 was added to 20 μL of each fraction. The reaction started with the addition of 50 μL of an hypoxanthine solution (0.09 mM in the above phosphate buffer), and the generated luminiscence due to the superoxide ions formation which react with a luminiscence reagent (MPEC) was measured in a Luminiscencer-PSN (AB-2200, Bio-Instrument, ATTO, Japan) . Lower amount of luminiscence indicated antioxidant activity, which was calculated as follow: $\text{antioxidant activity (\%)} = (\text{Measure value of control} - \text{Measure value of sample}) / \text{Measure value of control} \times 100$. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The test was carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

ACE inhibitory activity

Water soluble fractions of Spanish dry-cured ham extract were obtained after fractionation in Sephadex G-25 gel filtration column. Fractions were collected and

assayed for *in vitro* ACE inhibitory activity. In **Fig. 1**, we can observe marked *in vitro* ACE inhibitory activity in collected fractions corresponding to an elution volume from 200 mL to 320 mL with a maximum of inhibitory activity (80% of ACE inhibition) around elution volume from 240 mL to 250 mL. Fractions corresponding to an elution volume from 325 mL to 450 mL and from 505 mL to 625 mL showed also ACE inhibitory activity ranging from 20% to 30% of ACE inhibition. Fractions showing ACE inhibition were pooled and named sample 1 (elution volume from 200 mL to 320 mL), sample 2 (elution volume from 325 mL to 450 mL) and sample 3 (elution volume from 505 mL to 625 mL). These samples were further analyzed for *in vivo* antihypertensive activity in SHR.

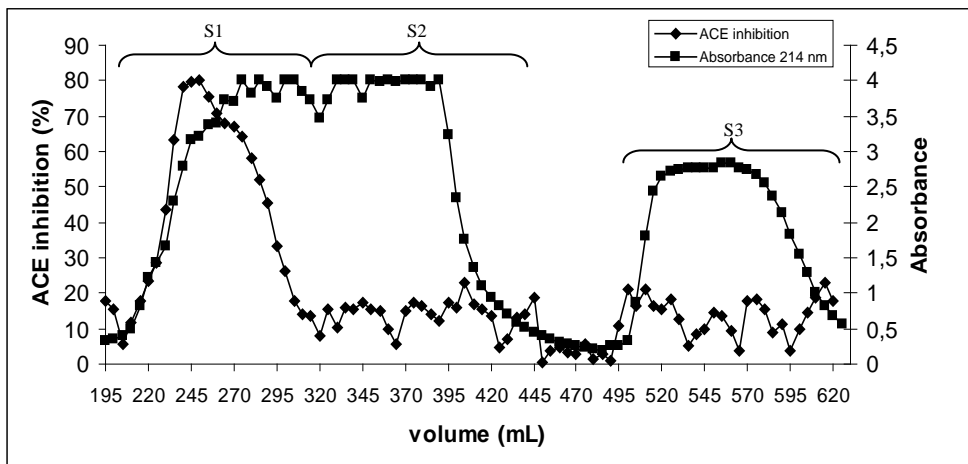


Figure 1. Fractionation of dry-cured ham extract in a Sephadex G-25 gel filtration column. Fractions were collected and assayed for *in vitro* ACE-inhibitory activity. For antihypertensive *in vivo* assay in the present study, fractions corresponding to an elution volume from 200 mL to 320 mL were pooled and named sample 1 (S1). The same procedure was followed for fractions corresponding to an elution volume from 325 mL to 450 mL (S2) and fractions corresponding to an elution volume from 505 mL to 625 mL (S3).

Antihypertensive activity

Sephadex G-25 separated the ham peptide extract mainly by peptide size. Under the conditions used, fractions eluted from 200 mL, corresponding to peptides of

less than 1700 Da (Aristoy & Toldrá, 1995). The fractions selected for the antihypertensive activity analysis previously showed *in vitro* ACE inhibitory activity. Three extracts of pooled fractions corresponding to an elution volume in the ranges 200 to 320 mL (sample 1), 325 to 450 mL (sample 2) and 505 to 625 mL (sample 3) from the Sephadex G-25 column were subjected to antihypertensive activity study. **Fig. 2** shows the response evolution of SBP of SHR after single oral administration of 4.56 mg sample 1/ kg B.W, 1.48 mg sample 2/ kg B.W and 8.7 mg sample 3/ kg B.W. Distilled water was used as a control and SBP of SHR did not change significantly during 24h in this case. As can be observed in the figure, SBP of SHR after sample 1 administration had the greatest decrease by 33.1 ± 8.68 mmHg ($p < 0.05$) and 38.38 ± 5.84 mmHg ($p < 0.01$) at 4 and 6h, respectively in relation to the control SHR group. The decrease was even observed at 8h after sample 1 administration. On the other hand, in rats fed with sample 2 it was also appreciated that mean SBP significantly decreased by 27.48 ± 5.11 mmHg ($p < 0.01$) at 6h after administration, whereas the SBP of SHR which were fed with sample 3 also showed a decrease by 23.56 ± 7.7 mmHg ($p < 0.05$) at 6h after single oral administration. In all cases SBP returned to pretreatment value after 24h.

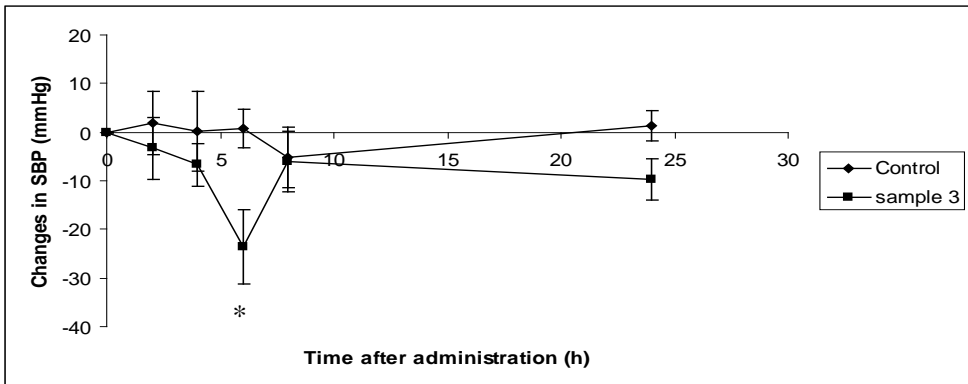
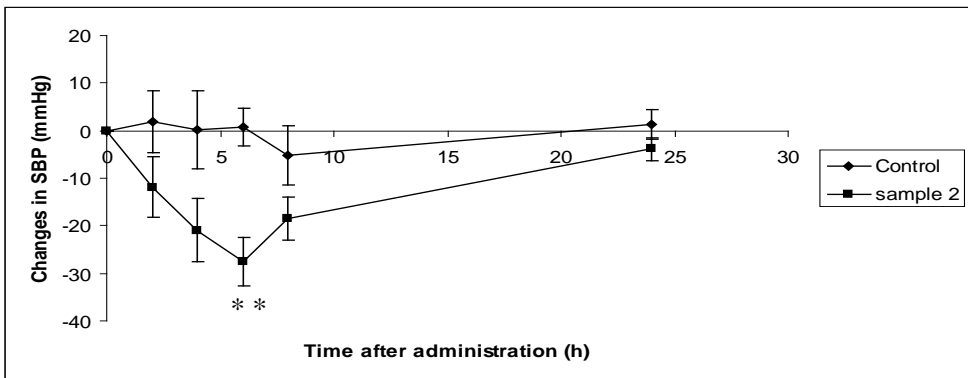
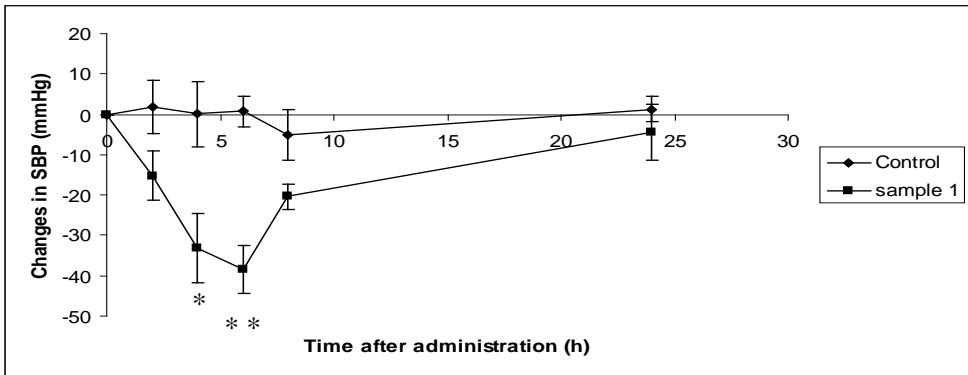


Figure 2. Antihypertensive effect of single oral administration of sample 1 (eluted volume from 200 to 320 mL), sample 2 (eluted volume from 325 to 450 mL) and sample 3 (eluted volume from 505 to 625 mL). Each point indicates the mean of systolic blood pressure of 8 SHR, and the vertical bars represent the standard error. Treatment in each case was control (distilled water) and (a) sample 1; b) sample 2; c) sample 3. Significant difference from control at each time: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Sample 3 was the most concentrated peptide extract and sample 2 had the lowest concentration of peptides (**Table 1**). However, sample 2 showed a highest antihypertensive activity as compared to sample 3. Eluted volume from 200 to 450 mL (samples 1 and 2) corresponded to Mr. of 1700 Da or lower. *In vitro* experiments (**Fig. 1**) revealed marked *in vitro* ACE-inhibitory activity in collected fractions corresponding to these elution volumes. As can be observed in **Fig. 1**, the most potent ACE-inhibitory activity was found in eluted volume from 200 to 320 mL, followed by eluted volume from 325 to 450 mL and from 505 to 625 mL. These volumes correspond with samples 1, 2 and 3, respectively. However, sample 2 showed higher antihypertensive effect compared with sample 1 and sample 3. This would be in accordance with previous reports indicating a discordance between *in vitro* and *in vivo* activity (Hartmann & Meisel, 2007; Lopez-Fandino, Otte & Van Camp, 2006).

ACE-inhibitory activities have been reported in extracts of dry-cured ham (Arihara & Ohata, 2008). Also dipeptides originated from the action of muscle dipeptidylpeptidases in dry-cured ham have been found to partially inhibit *in vitro* ACE-inhibitory activity (Sentandreu & Toldrá, 2007a). Dipeptidylpeptidases II and IV have been identified as the main enzymes responsible for the generation of bioactive peptides with stronger ACE-inhibitory action (Sentandreu & Toldrá, 2007b). So, based on such works, there is a clear evidence that ACE-inhibitory peptides may be generated during dry-cured ham processing. Peptide fractions extracted from dry-cured ham in this work have shown some degree of antihypertensive activity, independently of the concentration, but further studies are needed to identify amino acid sequence of such peptides.

Table 1. Antihypertensive activities of the three extracts of pooled fractions from the Sephadex G-25 column in spontaneously hypertensive rats by oral administration.

Sample	Peptide concentration (mg/mL)	SBP (mmHg) ^b 6h
1 (e.v. ^a from 200 to 320 mL)	0.83	38.38 ± 5.84**
2 (e.v from 325 to 450 mL)	0.27	27.48 ± 5.11**
3 (e.v from 505 to 625 mL)	1.59	23.56 ± 7.7*

^a eluted volume

^b Systolic blood pressure (mean ± SE, n=8) at 6h after single oral administration of samples 1, 2 and 3.

** Different from the control p< 0.01

* Different from the control p< 0.05

Antioxidant activity

DPPH is a stable free radical that shows maximum absorbance at 517 nm. When DPPH radicals encounter a proton-donating substrate such as an antioxidant, the radicals would be scavenged and the absorbance is reduced (Shimoda, Fujikawa, Yahara & Nakamura, 1992). The decrease in absorbance is taken as a measure for radical-scavenging activity and thus, antioxidant activity. **Fig. 3a** shows the DPPH radical-scavenging activity of the peptide fractions of dry-cured ham. The results clearly indicated a wide elution zone between 220 and 345 mL (fractions 44 to 69) with intense radical-scavenging activity (39% to 92%). Small peptides generated in dry-cured processing would be responsible for this antioxidant activity.

On the other hand, **Fig.3b** shows the superoxide ion extinguishing ability of the same eluted fractions expressed as percentage of antioxidant activity. In this case, antioxidant activity is presented in a narrower range, between 200 and 320 mL of elution volume, being fractions between 240 and 285 mL the most antioxidant with 41.67% and 50.27% of antioxidant activity, respectively. Fractions from 325

mL did not show any antioxidant activity. Both of the assayed methods for measuring antioxidant ability detected the maximum activity in the same fractions.

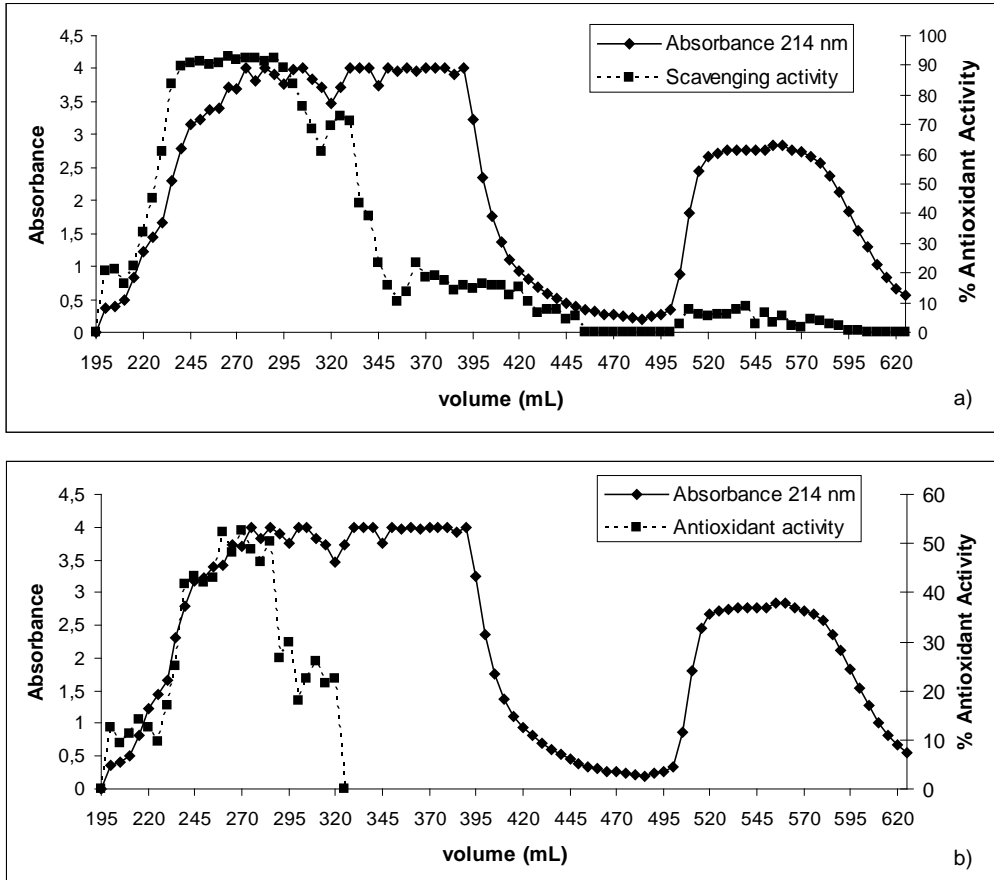


Figure 3. a) Fractionation of dry-cured ham extract in a Sephadex G-25 gel filtration column. Fractions were collected and tested for DPPH radical-scavenging and b) superoxide ion extinguishing ability, both expressed as percentage of antioxidant activity.

Several meat compounds have been identified as possessing antioxidant regulating properties. As an example, the two endogenous histidyl dipeptides carnosine and anserine (Arihara, 2006) are known to be the most abundant antioxidants in meat. These peptides have been reported to play many

physiological roles, such as prevention of diseases related to oxidative stress (Hipkiss & Brownson, 2000; Hipkiss, Preston, Himsworth, Worthington, Keown, Michaelis, Lawrence, Mateen, Allende, Eagles & Abbott, 1998). Antioxidant peptides other than carnosine and anserine have been reported to be generated by enzymatic treatment (papain or actinase E) of porcine myofibrillar proteins (Saiga, Tanabe & Nishimura, 2003). Thus, five peptides were identified from papain hydrolyzate and among them, Asp-Ala-Gln-Glu-Lys-Leu-Glu corresponding to a part of the sequence of porcine actin, showed the highest level of activity.

In a more recent study, Arihara, Tomita, Ishikawa, Itoh, Akimoto & Sameshima (2005) investigated antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of porcine actomyosin using a hypoxanthine-xanthine oxidase system as the source of superoxide anion. Three antioxidative peptides were isolated from a papain hydrolysate of pork actomyosin, which were sequenced as Asp-Leu-Tyr-Ala, Ser-Leu-Tyr-Ala and Val-Trp. In addition to the *in vitro* antioxidant activity, these peptides showed *in vivo* physiological activity *in vivo*. Each of these peptides had an anti-fatigue effect when orally administered to mice in an experiment using a treadmill.

Antioxidant peptides mostly contain below 20 amino acid residues per molecule and molecular masses of less than 6000 Da (Sun, He & Xie, 2004). Also, the antioxidant activity of peptides is closely related to their amino acid constituents, sequence (Grimble, 1994) as well as hydrophobicity (Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto & Nokihara, 1998). In addition to the presence of proper amino acids, their correct positioning in peptide sequence plays an important role in antioxidant activity of peptides (Rajapakse, Mendis, Jung, Je & Kim, 2005). Li, Han & Chen (2008) indicated that antioxidant activity of peptides of molecular mass of 500-1500 Da is stronger than of peptides above 1500 Da and peptides below 500 Da. On the other hand, antioxidant peptides with lower molecular weights have

higher chance to cross the intestinal barrier and exert biological effects (Roberts, Burney, Black & Zaloga, 1999). Thus, peptides present in these collected fractions having molecular masses lower than 1700 Da might have biological effect. Nevertheless, our study has to be considered as a preliminary study so, further research is needed to purify and characterise the peptides that can exert antioxidant activity *in vitro* and then, to determine potential *in vivo* antioxidant activity.

A proteomic study of water soluble and myofibrillar protein fractions was performed to obtain a better understanding of enzymatic action throughout the ripening process of Parma and S. Daniele dry-cured hams (Di Luccia, Picariello, Cacace, Scaloni, Faccia, Liuzzi, Alviti & Spagna, 2005). This study revealed that in 12-month-old dry-cured ham most myofibrillar proteins were completely hydrolyzed and that at this stage of ripening, in fact, in some Italian style ham samples, myosin heavy chain fragments were found. On the other hand, there is also evidence of the intense proteolysis in traditional Jinhua ham (Zhang, Zhen, Zhang, Zeng & Zhou, 2008; Zhou & Zhao, 2007). Typical Jinhua ham processing generally takes 8-10 months and during this long ripening process muscle protein as well as fat are hydrolysed to some extent by internal enzymes and many small peptides, free amino acids and other products are produced. So, dry-cured products other than Spanish dry-cured ham could be a good source of peptides with biological activity such as antihypertensive and/or antioxidant activity.

CONCLUSION

The present study indicates that peptide fractions from dry-cured ham exhibit *in vivo* antihypertensive activity and DPPH radical-scavenging activity as well as superoxide ion extinguishing ability. Regarding antihypertensive activity provided information on the generation of bioactive peptides during the physiological

digestion of dry-cured ham and/or the preservation of intact peptide sequences derived from the proteolysis during dry-cured ham processing, that could be absorbed along the small intestine and exert a biological function, was found. Also, as well as other compounds of dry-cured ham, peptides could contribute to its antioxidant and antihypertensive activities. The combination of antihypertensive and antioxidant capacities makes dry-cured ham a good source of bioactive compounds that could improve cardiovascular health or control related diseases. Furthermore, the occurrence of such antihypertensive peptides could, somehow, help counteract the adverse effect of NaCl, an ingredient in these products, helping to maintain a satisfactory blood pressure.

Nevertheless, this study has to be considered a first approach with regard to peptides in Spanish dry-cured ham that can exert biological activities. Further research should be done to purify and characterize the peptides present which are responsible for the antihypertensive and antioxidant activities found.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by KAKENHI (21380167) from Japan Society for the Promotion of Science. FPI Scholarship from Spanish Ministry of Science and Innovation to E.E., grants AGL2007-65379-C02-01 and AGL2010-16305 from Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER funds are fully acknowledged.

LITERATURE CITED

- Ames, B. N., Shinegaga, M.K. & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 90, 7915-7922.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57, 319-324
- Arihara, K. & Ohata, M. (2008). Bioactive compounds in meat. In F. Toldrá (Ed.), *Meat biotechnology* (pp. 231-249). New York: Springer.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.
- Arihara, K., Tomita, K., Ishikawa, S., Itoh, M., Akimoto, M. & Sameshima, T. (2005). Antifatigue peptides derived from meat proteins. Japan patent (submitted to government).
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In: Charalambous G, editor. *Food flavors: Generation, analysis and processes influence*. Amsterdam: Elsevier Science. p 1323-44.
- Bellatti, M., Dazzi, G., Chizzolini, R., Palmia, F. & Parolari, G. (1985). Modifications chimiques et physiques des protéines au cours de la maturation du Jambon de Parme. *Viandes Produits Carneés*, 6, 142-5.
- Bersuder, P., Hole, M. & Smith, G. (1998). Antioxidants from heated histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75, 181-187.
- Chen, H. M., Muramoto, K. & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. & Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Daniel, W. W. (1987). *Biostatistics: A foundation for analysis in the health science*. (pp. 135-140). New York: John Wiley and Sons.

Di Luccia, A., Picariello, G., Cacace, G., Scaloni, A., Faccia, M., Liuzzi, V., Alvitì, G., Musso, S. S. (2005). Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science*, 69, 479-491.

Escudero, E., Sentandreu, M. A., Arihara, K. & Toldrá, F. (2010). Angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2895-2901.

Grimble, G. K. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14, 419-447.

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

Hipkiss, A. R. & Browson, C. A. (2000). A possible new role for the anti-aging peptide carnosine. *Cell and Molecular Life Science*, 57, 747-753.

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

Hipkiss, A. R., Preston, J. E., Himsforth, D. T. M, Worthington, V. C, Keown, M., Michaelis, J., Lawrence, J., Mateen, A., Allende, L., Eagles, P. A. M. & Abbott, N. J. (1998). Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 37-53.

Houston, M. C. (2002). The role of vascular biology, nutrition and nutraceuticals in the prevention and treatment of hypertension. *Journal of the American Nutraceutical Association* (suppl. No.1), 1-71.

Jae- Young, J., Pyo Pam, P., Eun-Kyung, K. & Chang-Bum, A. (2009). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of Bambusae caulis in Liguamen. *Food Chemistry*, 113, 932-935

Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. & Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Animal Science Journal*, 74, 53-58.

Kitts, D. D. & 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. J. (2009). Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 64, 16-25.

- Li X. X., Han, L. J. & Chen, L. J. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1660-6.
- Liu, J. R., Chen M. J. & Lin C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467-2474.
- Lopez-Fandino, R., Otte, J. & 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.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3228-3234.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. (2009). Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in spanish dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8982-8988.
- Pihlanto, A. & Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175-276.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y. & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-182
- Ren, J., Zheng, X. Q, Liu, X. L. & Liu, H. (2010). Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 519-523.
- Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W. & Zaloga, G. P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-337.
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3661-3667.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. & Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86, 99-103.
- Sentandreu, M. A, Aristoy, M. C., Toldrá, F., Stoeva, S., Laib, K. & Voelter, W. (2003). Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 68, 64-69.

Sentandreu, M. A, Aristoy, M. C., Toldrá, F., Stoeva, S., Laib, K. & Voelter, W. (2003). Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 68, 64-69.

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

Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2007a). Oligopeptides hydrolysed by muscle dipeptidylpeptidases can generate angiotensin I converting enzyme inhibitory dipeptides. *European Food Research and Technology*, 224, 785-790.

Sentandreu, M. A & Toldrá, F. (2007b). Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chemistry*, 102, 511-515,

Sentandreu, M. A., Armenteros, M., Calvete, J. J., Ouali, A., Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (2007). Proteome identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3613-3619.

Sforza, S., Pigazzani, A., Motti, M., Porta, C., Virgili, R., Galaverna, G., Dossena, A. & Marchelli, R. (2001). Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity. *Food Chemistry*, 75, 267-273.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.

Shimomura, O., Wu, C., Murai, A. & Nakamura, H. (1998). Evaluation of five imidazo-pyrazinone-type chemiluminiscent superoxide probes and their application to the measurement of superoxide anion generated by *Listeria monocytogenes*. *Analytical Biochemistry*, 258, 230-235.

Sun, J., He, H. & Xie, B. J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6646-52.

Toldrá, F., Aristoy, M. C. & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33, 181-185.

Toldrá, F., Rico, E. & Flores, J. (1993). Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 157-61.

Toldrá, F. & Flores, M. (2008). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 331-352.

Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 49, (Suppl. 1), S101-S110.

Torruco- Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martinez-Ayala, A., Davila-Ortiz. & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 1597-1604.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111, 370-376.

Zhou, G. H. & Zhao, G. M. (2007). Biochemical changes during processing of traditional Jinhua ham. *Meat Science*, 77, 114-120.

Zhang, J., Zhen, Z., Zhang, W., Zeng, T. & Zhou G. (2009). Effect of intensifying high-temperature ripening on proteolysis, lipolysis and flavor of Jinhua ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 834-842.

Capítulo 2
Purification and identification of antihypertensive peptides in
Spanish dry-cured ham
Journal of Proteomics (en prensa, 2013)

Purification and Identification of antihypertensive peptides in

Spanish Dry-Cured ham

Elizabeth Escudero¹, Leticia Mora², Paul D. Fraser², Maria-Concepción Aristoy¹, Keizo Arihara³

and Fidel Toldrá¹✉

1. Instituto de agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avd. Agustín Escandino, 7 46980, Paterna,, Valencia, Spain

2. Centre for Systems and Synthetic Biology, School of Biological Sciences Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, TW20 OEX, UK

3. Faculty of Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada-shi 0348628, Japan

Abstract

Novel sequences exhibiting *in vitro* ACE inhibitory activity as well as *in vivo* antihypertensive activity were identified from Spanish dry-cured ham. Water soluble peptide extracts from dry-cured ham were purified by size-exclusion chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography and then, further identification of sequences was carried out by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. A total of 73 peptide sequences were identified from active fractions presenting 100% homology with different *Sus scrofa* skeletal muscle proteins. All identified peptides showed molecular weights between 374 and 1610 Da and amino acid sequences between 5 and 14 amino acids in length. Considering the low molecular weight and structural requirements for ACE inhibition some of the identified peptides were synthesised and their IC₅₀ calculated. The most potent peptide was found to be AAATP (IC₅₀ value of 100 µM). This peptide also showed good *in vivo* activity because it decreased systolic blood pressure by -25.62 ± 4.5 mmHg ($p < 0.05$) in spontaneous hypertensive rats after 8h administration. Other sequences yielded a moderate ACE inhibition. Results from this study show that Spanish dry-cured ham may represent a source of natural peptides with potential benefit for human health.

Keywords: Dry-cured ham, bioactive peptides, angiotensin I-converting enzyme, antihypertensive peptides, mass spectrometry.

INTRODUCTION

Dry-curing of ham involves many biochemical reactions leading to different compounds that confer its special and typical attributes of colour, texture, taste and flavour to the product. An intense proteolysis by endogenous muscle enzymes results in an accumulation of peptides [1, 2, 3] and free amino acids at the end of the dry-curing process [4, 5], being these products of great importance for its contribution to the final quality of dry-cured ham. Peptides have been investigated to elucidate their role in the development of taste and flavour [3], but little is known about the positive effect that they could exert on consumer's health.

In this context, Spanish dry-cured ham has been recently investigated as a natural source of peptides with antihypertensive activity by measuring *in vitro* angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and changes in systolic blood pressure (SBP) in spontaneously hypertensive rats (SHR) after oral administration of specific peptide fractions extracted from dry-cured ham [6].

Hypertension is one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases, stroke, and end-stage renal disease [7]. It has been recognized that nutritional factors play an important role in the prevention and/or treatment of hypertension and thus, research to find natural antihypertensive substances from food sources has gained great attention in latest years. Food intake is important not only as a source of nutrients but also as a source of bioactive compounds such as bioactive peptides. Different health effects have been attributed to food-derived peptides being the lowering of blood pressure (ACE inhibitory) the most extensively studied over the past three decades. These bioactive peptides are inactive within the sequence of parent protein but can be released by enzymatic hydrolysis of the proteins during food processing or even human digestion and thus exert their biological activity [8].

Angiotensin I-converting enzyme (ACE), a dipeptidyl carboxypeptidase (EC 3.4.15.1) that belongs to the class of zinc proteases [9] cleaves two amino acids from angiotensin-I, releasing angiotensin-II and inactivating the vasodilator bradykinin [10]. Angiotensin-II increases blood pressure by constricting arteries, and this is why ACE inhibitors can lower blood pressure by inhibiting the formation of angiotensin-II [11]. Therefore, the natural generation of bioactive peptides with ACE inhibitory activity from protein rich food sources provides an interesting strategy.

ACE inhibitory peptides have been identified in muscle tissues after hydrolysis of pork meat [12, 13] or derived from *in vitro* digestion of pork meat [4] and also, water-soluble fractions of dry-cured ham have shown *in vivo* antihypertensive activity in SHR and also *in vitro* ACE inhibitory activity in a previous study [6].

The main purpose of this work was to isolate and identify peptides present in the bioactive fractions found in our previous work [6], verify the individual *in vitro* ACE inhibitory activity for each identified peptide and assay *in vivo* the isolated peptide with highest ACE inhibitory activity.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Angiotensin-converting enzyme (from rabbit lung) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A). Abz-Gly-*p*-nitro-phe-pro-OH trifluoroacetate salt was obtained from Bachem AG. (Bubendorf, Switzerland). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Spanish dry-cured ham preparation

Three Spanish dry-cured hams were produced using raw hams from 6-months old pig (Landrace x Large White). Hams were bled and prepared according to traditional procedures consisting of the pre-salting stage using a mixture of curing

ingredients (salt, nitrate and nitrite) for 30 min in order to avoid microbiological spoilage, the salting stage, where hams were completely covered with solid salt and placed in a cold room (1-3 °C and 90-95% relative humidity for 12 days), post-salting (4-5 °C, 75-85% relative humidity for 60 days) and finally, the ripening period (14-20 °C, relative humidity down to 70% for 10 months).

Extraction and deproteinisation

Fifty grams of *Biceps femoris* muscle from the processed Spanish dry-cured hams were minced and homogenised with 200 mL of 0.01N HCl in a stomacher (IUL Instrument, Barcelona, Spain) for 8 min. The homogenate was centrifuged at 4°C for 20 min and 12000xg and, after filtering through glass wool, the supernatant was deproteinised by adding 3 volumes of ethanol and maintaining the sample 20 h at 4°C. After that, the sample was centrifuged again (12000 g for 20 min at 4°C) and the supernatant was dried in a rotatory evaporator. The dried deproteinised extract was dissolved in 25 mL of 0.01 N HCl, filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20°C until use.

Size-exclusion chromatography

A 5 mL aliquot of the deproteinised extract from the Spanish dry-cured ham was subjected to size-exclusion chromatography in order to fractionate the peptides according to their molecular mass. For this purpose, a Sephadex G25 column (2.5 x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 0.01 N HCl, was employed. The separation was performed at 4°C using 0.01 N HCl as eluent, at a flow rate of 15 mL/h. The first 195 mL were discarded, and then 5mL fractions were collected using an automatic fraction collector and further monitored by ultraviolet (UV) absorption at 214 nm (Agilent 8453 UV spectrophotometer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Fractions corresponding to an elution volume from 200 mL to 320 mL (sample 1) were pooled together, dried under vacuum and redissolved in 3 mL of 0.1%

trifluoroacetic acid (TFA) in bidistilled water. The same procedure was followed for fractions corresponding to an elution volumes from 325 mL to 450 mL (sample 2) and fractions eluted from 505 mL to 625 mL (sample 3). These pooled fractions showed *in vivo* antihypertensive activity and *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in a previous work [6].

Reversed-phase high performance liquid chromatography

A 500 μ L aliquot of each above prepared sample (sample 1, 2 and 3) was injected into an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Tech., California, USA). The column used in this experiment was a Symmetry C18 (4.6x250 mm, 5 μ m) from Waters Co. (Milford, MA, USA). Solvent A was 0.1% TFA in bidistilled water and solvent B contained 0.085% TFA in 60% Acetonitrile (ACN) / 40 % bidistilled water . Both mobile phases A and B were filtered through a 0.45 μ m filter and degassed prior to any analytical run. Peptides were first eluted with 99% solvent A for 5 min, followed by a linear gradient from 1% to 100% of solvent B in 80 min at a flow rate of 0.8 mL/min. The separation was monitored at a wavelength of 214 nm and 0.8 mL fractions were collected, dried in a vacuum centrifuge and assayed for ACE inhibitory activity. Those fractions showing remarkable ACE inhibition were further analyzed by nano liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS) in order to identify the peptides contained in them.

Assay of ACE Inhibitory Activity

The ACE inhibitory activity of the different fractions from reversed-phase high performance liquid chromatography and identified peptides was measured according to the method developed by Sentandreu and Toldrá (2006) [15]. This assay is based on the ability of ACE to hydrolyse the internally quenched fluorescent substrate *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-*L*-phenylalanyl-*L*-proline (Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro). A sample solution (50 μ L each collected fraction) was mixed with 50 μ L of 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3) containing 3 mU/mL of ACE, then

preincubating the mixture for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of 200 μL of 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3) containing 1.125 M NaCl and 10 mM Abz-Gly-Phe- (NO₂)-Pro, which was preincubated 10 min at 37°C. The reaction mixture was then incubated for 45 min at 37°C. The generation of fluorescence due to the release of *o*-aminobenzoylglycine (Abz-gly) by the action of ACE was measured using excitation and emission wavelengths of 355 and 405 nm, respectively. ACE inhibition of each collected fraction is expressed as percentage and then, the concentration of each identified and synthesised peptide required to inhibit 50% of ACE activity was defined as the IC₅₀.

Peptide identification by tandem mass spectrometry

Identification of the sequence of peptides present in fractions exhibiting remarkable ACE inhibitory activity was carried out by nLC- MS/MS analysis. The peptide fractions were resuspended in 10 μL of 0.1% TFA and cleaned/concentrated with ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to the nLC-MS/MS analysis according to the manufacturer recommendations. Peptides were eluted from ZipTip with 10 μL of 0.1% of formic acid in H₂O:ACN (50:50, v/v). The nLC- MS/MS analysis was performed in an Ultimate 3000 RSLC nano system from Dionex (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, UK) coupled to an AmaZon ETD ion-trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ionization source (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Two μL of the ZipTip elution were injected into the LC-MS system by using the autosampler. Sample was pre-concentrated on a Dionex Acclaim® PepMap 100 column (100 μm x 2 cm, C18, 5 μm , 100 A) (Dionex Corporation, LC Packings) at a flow rate of 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ and using 0.1% of TFA as mobile phase. After 3 minutes of pre-concentration, the trap column was automatically switched in-line with a Dionex Acclaim® PepMap RSLC nano-column (75 μm x 15cm, C18, 2 μm , 100A) (Dionex Corporation, LC Packings). Mobile phases consisted of solvent A,

containing 0.1% formic acid in water, and solvent B, containing 0.1% formic acid in 100% acetonitrile. Chromatographic conditions were a linear gradient from 5 to 40% solvent B in 60 min at a flow rate of 0.250 $\mu\text{L}/\text{min}$ at 30 $^{\circ}\text{C}$.

The column outlet was directly coupled to a nanoelectrospray ion source. Operating conditions for the ion trap mass spectrometer were positive polarity, capillary temperature of 200 $^{\circ}\text{C}$, capillary voltage of 4.5 V, and nitrogen was used as collision gas. First scan even was full MS scan from m/z value 100 to 1200. The ion trap was used in MS (2) in Ultrascan mode with a maximum accumulation time of 200 ms and an average of 5. Other source parameters and spray position were optimized with a tryptic digest of BSA protein.

Automated spectral processing and peak list generation was performed using Mascot Distiller v2.4.2.0 software (Matrix Science, Inc., Boston, MA, USA) (<http://www.matrixscience.com>). The database search was done through Mascot Daemon software in combination with the Mascot interface 2.2 (Matrix Science, Inc., Boston, MA, USA) (<http://www.matrixscience.com>). Regarding searching parameters, Mascot searches were done with none enzymatic specificity allowing one missed cleavage and a tolerance on the mass measurement of 100 ppm in MS mode and 0.6 Da for MS/MS ions. Deamidation of Asn-Gln and oxidation of Met were used as variable modifications. Identification of the protein origin of the identified peptides was done using NCBI non-redundant and UniProt protein databases. Matches of MS/MS spectra against sequences of the database were verified manually using Mmass software [16]. BLAST was used as a basic local alignment search tool to find regions of local similarities between the identified peptides and the protein sequences of *Sus scrofa* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Peptide Synthesis

ACE inhibitory peptides identified in the Spanish dry-cured ham fractions were synthesised by Gen Script Corporation (Piscataway, NJ, USA) and used for the *in vitro* inhibition assay of ACE activity. The purity of the synthesised peptides was certified by analytical nLC-MS/MS.

Antihypertensive activity

Animal preparation

Spontaneously hypertensive rats (SHR), 10 week old male rats, were purchased from Charles River Japan Inc. (Yokohama, Japan). The SHR were housed in cages in a controlled environment (12h light-dark cycle and temperature and humidity of 24°C and 50 to 60%, respectively). The SHR were fed a standard laboratory diet (CE-2; Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan), and tap water was freely available.

Oral administration of synthesised peptides

Single oral administration of the synthesized peptide dissolved in distilled water at a concentration of 2 mg/mL was performed using SHR of 21 week old (315 to 350 g in body weight). The systolic blood pressure (SBP) of SHR was 225 mmHg or higher. Oral administration was performed as follows: peptide suspended in distilled water and adjusted to 1 mg of peptide/ kg of body weight and control (distilled water) was administered by gastric intubation with a metal tube (Natsume Seisakusho Co., Tokyo, Japan).

Blood pressure measurement

The SBP was measured by the tail cuff method with a programmed electrospygmanometer (BP-98; Softron Co., Tokyo, Japan), after warming the rat in a thermostatted box at 40°C for 15 min. Every time the measurements were made in triplicate and the average values were reported.

Statistical analysis

Change in SBP was expressed as the difference in SBPs before and after administration. Data are expressed as means and standard errors. Student's t-test was used for statistical analysis (Daniel, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Purification and ACE inhibitory activity of fractions obtained from dry-cured ham

Results in our previous work after peptide fractionation through size-exclusion chromatography [6] revealed that the strongest ACE inhibitory activity (around 80% of ACE inhibition) was in fractions eluting from 200 mL to 320 mL (sample 1). Fractions corresponding to an elution volume from 325 mL to 450 mL (sample 2) and from 505 mL to 625 mL (sample 3) also showed ACE inhibitory activity but with less intensity (around 20% to 30% of ACE inhibition). All three groups of fractions showed antihypertensive activity *in vivo* [6].

In the present study, fractions corresponding to samples 1, 2 and 3 from the size-exclusion chromatography have been further separated by reverse-phase HPLC. During this chromatographic separation (**Fig. 1a** and **1b**), fractions of each sample have been collected (0.8 mL), dried and redissolved in 70 μ L of 150 mM Tris-base buffer (8.3), assaying the ACE inhibitory activity in each one. Sample 1 showed ACE inhibitory values ranging from 13% to 56%. Inside this sample, fractions eluting at 22, 23 and 24 min (**Fig. 1a**), showing average ACE inhibitory activity of 45%, were pooled together and the same procedure was followed for fractions 25, 26, 27 (average of ACE inhibitory activity of 33%), fractions 28, 29, 30 (average of ACE inhibitory activity of 27%) and fractions 31, 32 (average of ACE inhibitory activity of 25%). Fractions eluting at 8 and 24 min from sample 2 (**Fig. 1b**) were the only fractions with ACE inhibitory activity with a value of 34% and 27% of inhibition, respectively. These two fractions were kept separately for further

analysis. The collected fractions from sample 3 did not exert a remarkable inhibitory activity of ACE (data not shown).

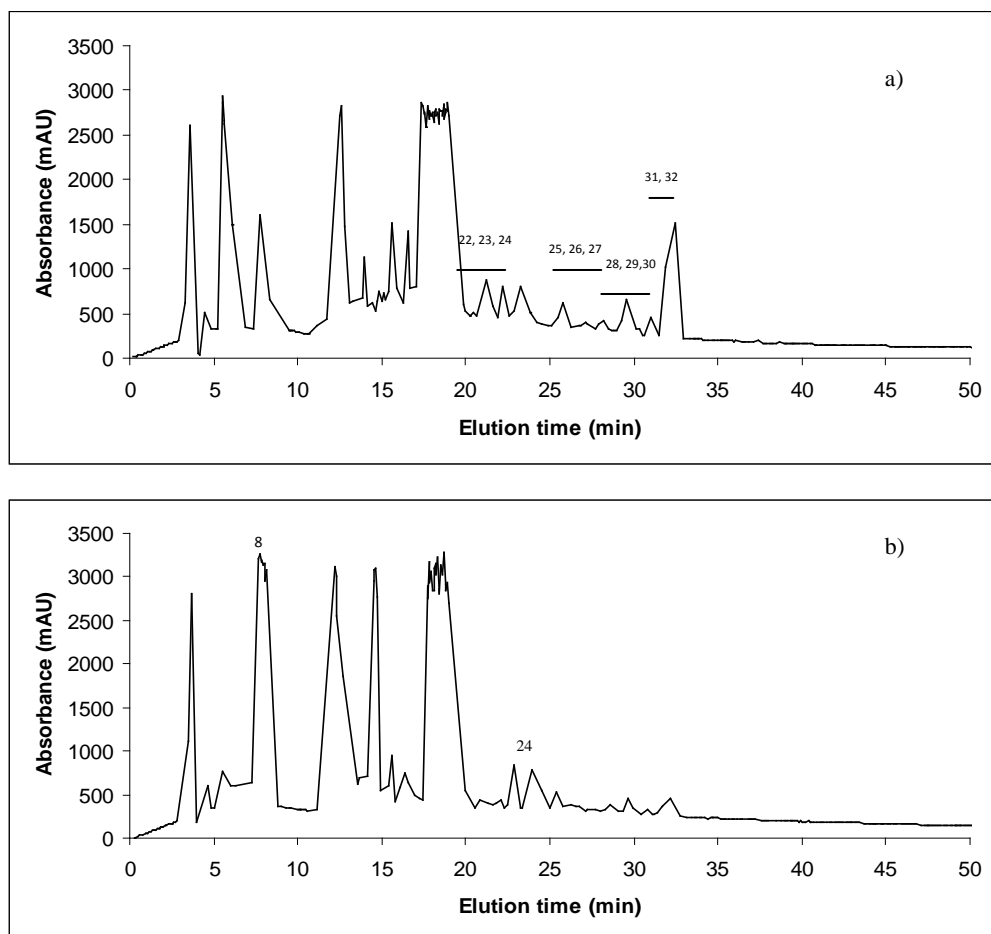


Figure 1. Reverse-phase chromatographic separation of the selected pooled fractions (**a**) sample 1 and **b**) sample 2) obtained from size-exclusion chromatography. Peak numbers indicate the collected fractions showing ACE inhibitory activity.

Identification of ACE inhibitory peptides by tandem mass spectrometry

Fractions from samples 1 and 2 showing ACE inhibition were further analysed separately by mass spectrometry with the aim of identifying and characterising their respective peptide content. They were subjected to nano-LC/MS/MS mass

spectrometry in order to determine respective molecular masses and sequences. A total of 73 peptides sequences were identified from sample 1 fractions as reported in **Tables 1, 2, 3** and **4**. These tables list the characterised amino acids sequences, the position of the identified peptides in the parent protein, the observed masses (Da) as well as experimental and calculated Mr.

In fractions 22 to 24 from sample 1 (**Table 1**) ten peptide sequences were obtained which were originated from carbamoyl-phosphate synthase 1, zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913-like, phosphoglycerate mutase 2 protein and myofibrillar proteins like myosin light chain I.

Table 1. Identification of peptides present in fractions 22 to 24 (sample 1) showing ACE inhibitory activity.

Peptide No	Peptide/Modification	Observed	Mr(expt)	Mr(calce)	Protein in <i>Sus scrofa</i>
1	G.GNGGA.E	375.02	374.02	374.16	carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial
2	P.SAGPN.G	444.99	443.98	445.18	zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913-like
3	R.DGTDQMWLPPV.V.L	425.86	1274.56	1275.58	phosphoglycerate mutase 2
4	L.RALGTNPTNA.E	507.60	1013.18	1013.53	myosin light chain I
5	L.RALGTNPTNAE.V	572.14	1142.27	1142.57	myosin light chain I
6	K.VLGNPSNEEMN.A Oxidation (M)	610.06	1218.10	1218.52	myosin light chain I
7	V.LGNPSNEEMN.A	552.57	1103.13	1103.46	myosin light chain I
8	L.QAISNNKDQGSYED.Gln->pyro-Glu (N-term Q)	718.69	1435.37	1435.62	myosin light chain I
9	L.QAISNNKDQGSYED.F Deamidated (NQ)	785.18	1568.35	1568.66	myosin light chain I
10	L.QAISNNKDQGSYED.F 2 Deamidated (NQ)	785.70	1569.38	1569.64	myosin light chain I

Twenty peptides were characterised in fractions 25 to 27 from sample 1 that were originated from myosin light chain phosphorilatable fast skeletal muscle protein, myosin regulatory light chain 2 protein, acyl Coa binding protein and creatin kinase M-type protein (**Table 2**).

Table 2. Identification of peptides present in fractions 25 to 27 (sample 1) showing ACE inhibitory activity.

No Peptide	Position		Sequence	Observed Mr(expt)		Mr(calc)	Protein in <i>Sus scrofa</i>
	Start	End					
11	42	48	R.DGIIDKE.D	395.04	788.07	788.39	myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle protein
12	98	103	E.DVITGA.F	575.20	574.19	574.30	myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle protein
13	144	154	F.PPDVGGNVVDYK.N	580.65	1159.28	1159.55	myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle protein
14	145	154	P.PDVGGNVVDYK.N	532.09	1062.16	1062.50	myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle protein
15	146	153	P.DVGGNVVDY.K	419.54	837.07	837.35	myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle protein
16	12	16	A.AEGGS.S	419.04	418.03	419.17	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform <i>Bos taurus</i> *
17	27	31	L.FIYSH.Y	333.55	665.09	665.32	Acyl-CoA-binding protein
18	32	41	H.YKQATVGDIN.T	554.62	1107.22	1107.56	Acyl-CoA-binding protein
19	2	7	M.PFGNTH.N Deamidated (NQ)	337.00	671.98	672.29	creatine kinase M-type
20	54	65	L.DDVIQTGVNDNPG.H	615.11	1228.21	1228.56	creatine kinase M-type
21	55	62	D.DVIQTGVND.N	423.55	845.09	845.41	creatine kinase M-type
22	55	65	D.DVIQTGVNDNPG.H	557.62	1113.22	1113.53	creatine kinase M-type
23	55	67	D.DVIQTGVNDNPGHP.F	674.67	1347.33	1347.64	creatine kinase M-type
24	90	94	F.DPIIQ.D	585.22	584.21	584.32	creatine kinase M-type
25	90	95	F.DPIIQD.R	700.24	699.23	699.34	creatine kinase M-type
26	90	96	F.DPIIQDR.H	428.57	855.13	855.45	creatine kinase M-type
27	111	121	L.NHENLKGDDLD.D Deamidated (NQ)	606.62	1211.23	1211.54	creatine kinase M-type
28	114	122	E.NLKGDDLDL.P Deamidated (NQ)	474.05	946.09	946.42	creatine kinase M-type
29	116	125	L.KGGDDLDPNY.V	547.07	1092.12	1092.47	creatine kinase M-type
30	117	121	K.GGDDL.D	475.14	474.13	475.19	creatine kinase M-type

* Peptide identified in *Bos taurus* species with 100% homology with *Sus scrofa*.

Twenty nine peptides (**Table 3**) were identified in fractions 28 to 30 from sample 1 as originated from four proteins: creatine kinase M-type (*Bos taurus*), myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform (*Bos taurus*), myosin regulatory light chain 3-like and Ca²⁺ binding protein-like protein. Fourteen peptides in fractions 31 and 32 from sample 1 were characterised as originated from creatine kinase M-type protein (*Bos taurus*) and myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform (*Homo sapiens*) (**Table 4**). A total of six peptides from sample 2 were identified in fractions 8 and 24 being the peptides from fraction 8 originated from acetylcholinesterase (*Bos taurus*), allantoicase and fibrillin-3 and those from fraction 24 identified from acetylcholinesterase (*Bos taurus*) and allantoicase (**Table 5**).

Table 3. Identification of peptides present in fractions 28 to 30 (sample 1) showing ACE inhibitory activity.

Peptide No	Start	End	Sequence	Observed	Mf(exp)	Mf(calcd)	Protein
31	15	23	F.KAEEY PDL.S	547.08	1092.15	1092.50	Creatine kinase M-type Bos taurus*
32	54	64	L.DDVIQTGVNDP.G	586.62	1171.23	1171.54	Creatine kinase M-type Bos taurus
33	54	67	L.DDVIQTGVNDP.GHP.F	732.21	1462.40	1462.67	Creatine kinase M-type Bos taurus
34	55	64	D.DVIQTGVNDP.G	529.12	1056.23	1056.51	Creatine kinase M-type Bos taurus
35	55	67	D.DVIQTGVNDP.GHP.F	674.70	1347.38	1347.64	Creatine kinase M-type Bos taurus
36	59	68	Q.TGVDNPGHPF.I	520.59	1059.16	1039.47	Creatine kinase M-type Bos taurus
37	60	68	T.GVDNPGHPF.I	470.05	938.09	938.42	Creatine kinase M-type Bos taurus
38	114	125	E.NLKGDDLDPNY.V	661.18	1320.34	1319.60	Creatine kinase M-type Bos taurus
39	115	125	N.LKGGDDLDPNY.V	603.89	1205.77	1205.56	Creatine kinase M-type Bos taurus
40	115	126	N.LKGGDDLDPNY.V.L	653.19	1304.36	1304.62	Creatine kinase M-type Bos taurus
41	118	126	G.GDDLDPNY.V.L	504.06	1006.11	1006.42	Creatine kinase M-type Bos taurus
42	119	126	G.DDLDPNY.V.L	475.55	949.09	949.40	Creatine kinase M-type Bos taurus
43	162	166	A.LNSLT.G	547.17	546.16	546.30	Creatine kinase M-type Bos taurus
44	293	297	R.GGVHV.K	467.22	466.21	467.25	Creatine kinase M-type Bos taurus
45	37	47	T.VIDQNRDGIID.K	629.20	1256.39	1256.64	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Bos taurus*
46	144	153	A.FPPDVGGNV.D.Y	508.55	1015.09	1015.46	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Bos taurus
47	145	154	F.PPDVGGNV.D.Y.K	516.60	1031.18	1031.46	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Bos taurus
48	27	40	A.PAPAPPPKPEPFD.A	760.74	1519.46	1519.72	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
49	28	40	P.APAPPPKPEPFD.A	712.22	1422.43	1422.67	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
50	29	40	A.PAPEPPKPEPFD.A	676.66	1351.31	1351.63	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
51	30	39	P.APEPPKPEPFD	570.59	1139.17	1139.55	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
52	30	40	P.APEPPKPEPFD.A	628.15	1254.29	1254.58	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
53	32	40	P.EPPKPEPFD.A	544.09	1086.17	1086.49	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
54	48	55	E.FTPEQIEE.F	496.56	991.10	991.45	myosin light chain 3-like [Sus scrofa]
55	18	30	A.ISNNKDCQSYEDF.V Deamidated (NQ)	759.67	1517.32	1516.63	Ca2+-binding protein-like protein [Sus scrofa]
56	19	30	I.SNNKDCQSYEDF.V Deamidated (NQ)	702.63	1403.25	1403.55	Ca2+-binding protein-like protein [Sus scrofa]
57	20	30	S.NNNKDCQSYEDF.V Deamidated (NQ)	659.09	1316.17	1316.52	Ca2+-binding protein-like protein [Sus scrofa]
58	21	30	N.NKDCQSYEDF.V Deamidated (NQ)	602.08	1202.15	1202.47	Ca2+-binding protein-like protein [Sus scrofa]
59	22	30	N.KDQGSYEDF.V	544.56	1087.10	1087.45	Ca2+-binding protein-like protein [Sus scrofa]

*Creatine kinase of Bos taurus (KCRM_BOVIN) share its sequence with creatine kinase of Sus scrofa (KCRM_PIG) in a 99%.

*Same with myosin regulatory light chain 2 of Bos taurus (MLRS_BOVIN) and Sus scrofa (Q5XLD2_PIG).

Table 4. Identification of peptides present in fractions 31 and 32 (sample 1) showing ACE inhibitory activity

Peptide No	Start	End	Sequence	Observed	Mr(expt)	Mr(cale)	Protein
60	16	23	K.ABEEYPDL.S	483.07	964.13	964.40	Creatine kinase M-type Bos taurus
61	18	23	E.EEYPDL.S	765.23	764.23	764.32	Creatine kinase M-type Bos taurus
62	44	54	R.DKETPSGFILD.D	605.14	1208.27	1208.56	Creatine kinase M-type Bos taurus
63	45	54	D.KETPSGFILD.D	547.63	1093.25	1093.53	Creatine kinase M-type Bos taurus
64	54	68	L.DDVIQITGVDPNPGHPF.I	805.72	1609.43	1609.74	Creatine kinase M-type Bos taurus
65	55	68	D.DVIQITGVDPNPGHPF.I	748.21	1494.41	1494.71	Creatine kinase M-type Bos taurus
66	55	68	D.DVIQITGVDPNPGHPF.I Deamidated (NQ)	748.71	1495.40	1495.69	Creatine kinase M-type Bos taurus
67	71	80	M.MKEASGPINF.T Oxidation (M)	555.09	1108.17	1108.52	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
68	71	81	M.MKEASGPINF.V	597.60	1193.19	1193.58	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
69	71	81	M.MKEASGPINF.V Oxidation (M)	605.62	1209.23	1209.57	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
70	74	81	E.ASGPINFT.V	403.56	805.10	805.40	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
71	143	152	A.FPPDVGGNVD.Y	508.56	1015.11	1015.46	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
72	143	153	A.FPPDVGGNVDY.K	590.09	1178.17	1178.52	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
73	143	154	A.FPPDVGGNVDYK.N	654.17	1306.32	1306.62	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform Homo sapiens
Creatine kinase of Bos taurus (KCRM_BOVIN) share its sequence with creatine kinase of Sus serofa (KCRM_PIG).							
Same with myosin regulatory light chain 2 in human (MLRS_HUMAN) and Sus serofa (Q5XLD2_PIG).							

Table 5. Identification of peptides present in fractions 8 and 24 (sample 2) showing ACE inhibitory activity

Fraction	Start	End	Observed mass	Mr (expt)	Mr (calc)	Sequence	Protein
8	259	263	444.99	443.98	445.18	Q.SGAPN.G	Acetylcholinesterase <i>Bos taurus</i>
8	133	137	429.03	428.02	429.22	G.AAATP.E	Allantoicase <i>Sus scrofa</i>
8	511	521	427.92	426.92	428.96	QPSLCANGRCIN	Fibrillin-3 <i>Sus scrofa</i>
24	110	114	582.21	581.20	581.23	G.FEGTE.M	Acetylcholinesterase <i>Bos taurus</i>
24	155	159	408.97	407.97	407.17	Y.SGASS.L	Acetylcholinesterase <i>Bos taurus</i>
24	94	99	683.24	682.23	682.28	G.FDVDTS.Y	Allantoicase <i>Sus scrofa</i>

All the peptide sequences identified in this work were searched in Blast and revealed 100% homology with *Sus scrofa* skeletal muscle proteins. However, according to UniProt database some of the identified peptides were derived from *Bos taurus* and *Homo sapiens* species. This can be explained by the fact that *Sus scrofa* and *Bos taurus* species share most of their proteome. The percentage of homology between *Sus scrofa* and *Bos taurus* or *Homo sapiens* species for each of the identified proteins is shown in the footnotes of **Tables 2, 3, 4** and **5**.

All peptides characterised from samples 1 and 2 showed molecular mass values between 374.02 and 1609.74 and amino acid sequences between 5 and 14 amino acids in length. ACE inhibitory as well as antihypertensive activity was observed in our previous study [6] in fractions coming from size-exclusion chromatography and corresponding to samples 1 and 2. In the present study, a large number of peptides have been identified and characterised after purifying these bioactive fractions. Some of these peptides could be responsible of the bioactivity observed in our preceding study. Biological activities of peptides are related to their amino acid composition, sequence, size and configuration [17]. Our results are consistent with the fact that ACE inhibitory peptides usually contain between 2 and 12 amino acids [18]. On the other hand, most food protein-derived peptides with ACE

inhibitory abilities have relatively low molecular weights, generally ranging from dipeptides to pentapeptides with Mr 150-800 [19]. Considering the low molecular mass and the structural requirements for ACE inhibition, some identified and characterised peptides were synthesised and their IC₅₀ calculated (see **Table 6**). It was suggested that most naturally occurring ACE inhibitory peptides contain Pro, Lys or aromatic amino acid residues [20, 21, 22]. Binding to ACE was strongly influenced by the residues at each of the three positions closest to the C-terminal, whereby hydrophobic amino acids, e.g., Pro, were more active if present at the C-terminal position [23]. In this respect, peptide AAATP (fraction 8, sample 2) ends with a proline residue, one of the most favourable C-terminal amino acid for binding to the ACE active site [20]. This peptide showed a high inhibitory activity with a determined IC₅₀ value of 100 µM. Other synthesised peptides containing proline at each of the three positions closest to the C-terminus exerted a weaker ACE inhibitory activity (see **Table 6**).

Table 6. ACE inhibitory activity (IC₅₀) of synthetic peptides.

Sample	Fraction	Peptide	IC ₅₀ (µM)
1	22-24	GNGGA	> 1000
		SAGPN	n.a ^a
1	25-27	DVITGA	900
		GGDDL	n.a
1	28-30	KDQGSYE	>1000
		GVDNPGF	>1000
		LNSLT	>1000
1	31-32	KAEDEYP	>1000
		EEYPDI	>1000
		ASGPINF	975
2	8	AAATP	100

^a No ACE inhibitory activity found

Peptide ASGPINFT showed an IC_{50} value of 975 μ M, being its activity possibly induced by the aromatic amino acid residue F. Peptide DVITGA yielded an ACE inhibition with an IC_{50} value of 900 μ M. This peptide has alanine at the C-terminus, which is supposed to play an important role in binding to ACE [24]. The other synthesised peptides (Table 6) exerted ACE inhibitory activity but in a more moderate intensity. Peptide AAATP was identified in fraction 8 from sample 2 which was composed by fractions of lower Mr than purified fractions from sample 1. Also, peptide AAATP showed the highest *in vitro* ACE inhibition being this in accordance with the highest *in vivo* antihypertensive activity observed for this sample 2 as reported in our previous work [6]. So, the next step was the *in vivo* assay of this peptide with spontaneous hypertensive rats (SHR's). This peptide successfully decreased the systolic blood pressure (SBP) in the SHR's ($p < 0.05$). The antihypertensive effect of AAATP was clearly established when 1mg of peptide/kg of body weight was administered and the effect of this dose was significant ($p < 0.05$) at 8h after administration. **Figure 2** shows the SBP of SHR's after peptide administration having the largest decrease by 25.6 ± 4.5 mmHg ($p < 0.05$) at 8h in relation to the control SHR's group.

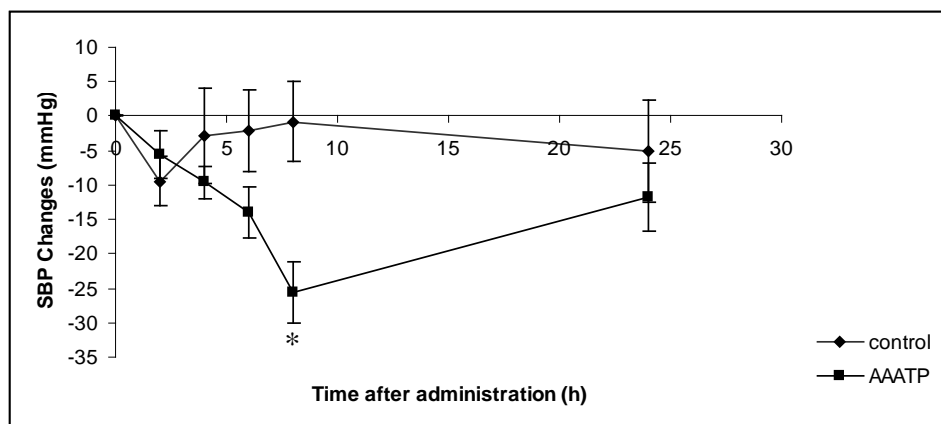


Figure 2. Antihypertensive effect of single oral administration of peptide AAATP. Each point indicates the mean of systolic blood pressure of 6 SHR^s, and the vertical bars represent the standard error. Treatment was control (distilled water) and peptide AAATP. Significant difference from control at each time: *P<0.05.

These kind of animals constitute an accepted model for human essential hypertension [25]. The development of hypertension in these animals is very similar to that in humans [26]. This experiment demonstrated that the peptide AAATP could effectively reduce SBP in SHR^s. The presence of proline at the C-terminal position enhance the inhibition of ACE, as explained before. Also, the aminoacid alanine close to the C-terminal position might also positively influence the binding to ACE. The antihypertensive effect observed when this sequence was administered to the SHR^s was probably due to the *in vivo* inhibition of ACE by this peptide in the animals. The antihypertensive activity of the peptidic sequence when it is orally administered is dependent on its ability to reach the target site without being degraded and inactivated by intestinal or plasma peptidases. The results of the *in vivo* experiments in this study suggest that this peptide may be resistant to digestion in the gastrointestinal tract and that the active sequence would not be destroyed by intestinal or plasma peptidases [27]. Furthermore, the sequence is short and can thus be efficiently absorbed through the intestine of

the animals in an active form. In fact, Fujita and Yoshikawa (1999) explain the high *in vivo* effect of the ACE inhibitors derived from food proteins by their higher affinity for the different tissues and their slower elimination.

The other synthesised peptides appeared to have moderate/low ACE inhibitory activity *in vitro*, so that the ACE inhibitory activity found in some fractions of samples 1 and 2 after purification by reverse-phase chromatography could indicate a possible synergistic effect among various peptides, as has been already reported [28].

CONCLUSIONS

In conclusion, our study reports the identification of peptides present in water soluble fractions of Spanish dry-cured ham that exhibit *in vivo* antihypertensive activity. The sequences of the identified peptides have been determined and respective IC₅₀ values assayed. The most potent peptide sequence was identified to be AAATP (IC₅₀ value of 100 µM). Also, this peptide effectively decreased systolic blood pressure in SHR's. The short-term effect of AAATP on SBP was demonstrated, and to the best of our knowledge this is the first report deal with the *in vivo* evaluation of antihypertensive activity of an isolated peptide from dry-cured ham. Other sequences like ASGPINFT and DVITGA yielded a moderate ACE inhibition. On the other hand, peptides identified in our study but not further synthesised for determining IC₅₀ value were found to share partial sequence homology with peptides that have been previously described in the literature as ACE inhibitors. These identified peptides could also contribute to the bioactivity reported in dry-cured ham.

Results from this work showed that Spanish dry-cured ham may represent a source of natural peptides able to reduce both ACE inhibitory activity and systolic blood pressure. Furthermore, the natural presence of such peptides could

counteract the adverse effect of NaCl, basic ingredient in this product, helping to maintain a healthy blood pressure.

ACKNOWLEDGEMENTS

FPI Scholarship to E.E. and grant AGL2010-16305 both from Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER funds are fully acknowledged. HEFCE infrastructure funding is acknowledged for MS equipment to P.D.F. L.M and P.D.F are grateful to the EU-FP7 Marie Curie IEF scheme (FOOSAF project) for financial resources. KAKENHI (21380167) from Japan Society for the Promotion of Science is also fully acknowledged.

LITERATURE CITED

- [1] Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 3228-34.
- [2] Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M.. Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in spanish dry-cured ham. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 8982-88.
- [3] Sentandreu, M. A, Aristoy, M. C., Toldrá, F., Stoeva, S., Laib, K. & Voelter, W. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *J Food Sci* 2003; 68: 64-69.
- [4] Sforza, S., Pigazzani, A., Motti, M., Porta, C., Virgili, R., Galaverna, G., Dossena, A. & Marchelli, R. Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity. *Food Chem* 2001; 75: 267-73.
- [5] Toldrá, F., Aristoy, M. C. & Flores, M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Res Int* 2000; 33: 181-185.
- [6] Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K., Toldrá, F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Sci* 2012; 91: 306-311
- [7] Arauz-Pacheco, C., Parrott, M.A., Raskin, P. The treatment of hypertension in adult patients with diabetes. *Diab Care* 2002; 25: 134-147.
- [8] Korhonen, H. J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *Aust. J. Dairy Technol* 2009; 64: 16-25.
- [9] Wang, J.P., Hu, J.N., Cui, J.Z., Bai, X.F., Du, Y.G., Miyaguchi, Y., Lin, B.C. Purification and identification of ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 2008; 111: 302-308.
- [10] Erdös, E.G., Tan, F., Skidgel, R.A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* 2010; 55: 241-220.
- [11] Parfrey, P.S. Inhibitors of the renin-angiotensin system: Proven benefits, unproven safety. *Ann Intern Med.* 2008; 4: 76-77.

- [12] Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. & Itoh, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci* 2001; 57: 319-324
- [13] Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. & Muguruma, M. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Anim Sci J* 2003; 74: 53-58.
- [14] Escudero, E., Sentandreu, M. A, Arihara, K. & Toldrá, F. Angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 2895-2901.
- [15] Sentandreu, M. A., Toldrá, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. **Food Chem** 2006; 97: 546-554.
- [16] Strohal M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V. mMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal Chem* 2010; 82: 4648-51.
- [17] Matsui, T., Matsumoto, K. Antihypertensive peptides from natural resources. *Adv Phyt* 2006; 255-271
- [18] Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1994; 77: 917-922.
- [19] Zhang, F., Wang, Z., Xu, S. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with in vitro angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability. *Food Chem* 2009; 117: 387-392.
- [20] Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., Cushman, D.W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1980; 255: 401-407.
- [21] Kawakami, A., Kayahara, H. Synthesis of Leu-Lys-Tyr derivatives and their interaction with angiotensin converting enzyme. *J Jap Soc Nutr Food Sci* 1993; 46: 425-428.
- [22] Suetsuna, K., Nakano, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *J Nutr Biochem* 2000; 11: 450-454.
- [23] Rohrbach, M.S., Williams, E.B., Jr., Rolstad, R.A. (1981). Purification and substrate specificity of bovine angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1981;256: 225-230.

[24] Majumder, K., Wu, J. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked eggs. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 471-477.

[25] FitzGerald, R.J., Murray, B.A., & Walsh, G.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004; 134: 980-988.

[26] Okamoto, K., & Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 1963; 27: 282-293.

[27] Balti, R., Nejar-Arroume, N., Bougatef, A., Guillochon, D., & Nasri, M. Three novel angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Res Int* 2010; 43: 1136-1143.

[28] Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res (N.Y.)* 2004; 24: 469-486.

Capítulo 3
Identification of novel antioxidant peptides generated in
Spanish dry-cured ham
Food Chemistry (en prensa, 2013)

Identification of Novel Antioxidant Peptides Generated in Spanish Dry-Cured ham

Elizabeth Escudero¹, Leticia Mora², Paul D. Fraser², Maria-Concepción Aristoy¹
and Fidel Toldrá¹✉

1. Instituto de agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avd. Agustín Escandino, 7 46980, Paterna, Valencia, Spain

2. Centre for Systems and Synthetic Biology, School of Biological Sciences Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, TW20 OEX, UK.

Abstract

The objective of this study was to purify and identify antioxidant peptides present in a water soluble extract of Spanish dry-cured ham. The initial extract was loaded into a Sephadex G25 column and fractions showing antioxidant activity were collected, pooled together and subjected to reversed-phase chromatography for further purification. Using a nano-LC-MS/MS analysis, 27 peptides were identified in these fractions. Several key peptides were selected for synthesis and the determination of their antioxidant properties using the DPPH radical-scavenging assay and reducing power analysis. The strongest radical-scavenging activity was observed with peptide SAGNPN which showed 50% antioxidant activity at a concentration of 1.5 mg/mL. On the other hand, peptide GLAGA showed the higher reducing power with 0.5 units of absorbance at 700 nm at a concentration of 1mg/mL. Other synthesized sequences showed lower antioxidant activity. The results evidence the potential of Spanish dry-cured ham as a source of antioxidant peptides naturally generated during the dry-curing process.

Keywords: Dry-cured ham, antioxidant peptides, DPPH radical-scavenging activity, reducing power, mass spectrometry, proteomics.

INTRODUCTION

Spanish dry-cured ham is a dry-cured product that has increased in popularity over the world due to its unique and typical quality characteristics. During ripening, the proteolysis of sarcoplasmic and myofibrillar proteins is one of the main biochemical phenomena (Díaz Fernández, García de Fernando, De la Hoz, & Ordoñez, 1997; Fadda, Sanz, Vignolo, Aristoy, Oliver, & Toldrá, 1999; Roseiro, Santos, Sol, Borges, Anjos, Gonçalves, & Carvalho, 2008). Endogenous endopeptidases from skeletal muscle (calpains and specially cathepsins) have been considered as main actors in the degradation of muscle proteins during dry-curing (Toldrá & Flores, 1998). The process involves a decrease of high molecular-weight proteins, resulting in the formation of polypeptides that may be degraded by peptidyl peptidases and aminopeptidases into smaller peptides and free amino acids (Toldrá, Aristoy & Flores, 2000). Some peptides have been identified through proteomic tools (Mora, Sentandreu, Koistinen, Fraser, Toldrá & Bramley, 2009; Mora, Sentandreu, Fraser, Toldrá & Bramley, 2009). The peptides resulting from the hydrolysis of sarcoplasmic and myofibrillar proteins are mainly related to sensory aspects of dry-cured ham (Aristoy & Toldrá, 1995). Other properties and functionalities, such as bioactivity await elucidation. Several examples exist where protein hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis have been shown to have a wide range of biological activities, including antioxidant activity, which is one of the most common studied bioactivity in animal protein hydrolysates (Chang, Wu & Chiang, 2007; Saiga, Tanabe & Nishimura, 2003; Wang, Zhang, Zhang, Yao, Mao & Ren, 2008; Toldrá & Reig, 2011). Although a good deal of evidence has confirmed the *in vitro* antioxidant activity of bioactive peptides, it is important but hard to consider a relation between *in vitro* antioxidant properties and *in vivo* antioxidant capacity of peptides since they are subject to degradation and modification in the intestine, vascular system and liver. In this respect, it has been

indicated that a small portion of bioactive peptides can pass the intestine barrier and it can present the biological effects in tissue level (Gardner 1988; Gardner 1998). Intact absorption of peptides is regarded as a normal physiological process which is different from regular peptide transporter route (Gardner 1988).

Reactive oxygen species (ROS) and other free radicals produce oxidative damage to DNA, proteins, and other macromolecules such as lipids. ROS are implicated in the etiology of many degenerative diseases such as diabetes, cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders and, in general, aging. So, interest in research and use of antioxidants for the prevention and treatment of such diseases has increased (Pham-Huy, He & Pham-Huy, 2008).

The antioxidant peptides possess metal-chelating or hydrogen/electron donating activity, which enables interaction with free radicals terminating or preventing the radical chain reactions proceeding (Wang, Zhao, Zhao & Jiang, 2007).

Some studies concerned with the purification and characterisation of antioxidant peptides have been reported (Lee et al., 2010; Liu, Wang, Duan, Guo & Tang, 2010; Ren, Zheng, Liu & Liu, 2010; Di Bernardini et al., 2011). More recently, Spanish dry-cured ham has been studied as a natural source of peptides with antioxidant activity (Escudero, Aristoy, Nishimura, Arihara & Toldrá, 2012). This study revealed that water soluble fractions of Spanish dry-cured ham exhibited antioxidant activity probably due to the content of some relevant peptides with antioxidant properties. To date, there are no studies about purification and identification of these individual antioxidant peptides present in dry-cured ham. The purpose of the present study was to purify and identify the peptides present in the water soluble antioxidant fractions detected in our previous work (Escudero et al., 2012). Following purification and identification, some peptides were selected, synthesized and assayed to verify their individual antioxidant activity.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Chemicals trifluoroacetic acid (TFA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), potassium ferricyanide and ferric chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile HPLC grade and formic acid were from Scharlab (Sentmenat, Spain). All other chemicals and reagents used were of analytical grade and water used was bidistilled milliQ quality (Millipore, Bedford, MA, USA).

Spanish dry-cured ham preparation

Three Spanish dry-cured hams were produced using raw hams from 6-months old pig (Landrace x Large White). Hams were bled and prepared according to traditional procedures consisting of the pre-salting stage using a mixture of curing ingredients (salt, 300 mg nitrate/kg ham and 100 mg nitrite/kg ham) for 30 min in order to avoid microbiological spoilage, the salting stage, where hams were completely covered with solid salt, piled up without touching each other and placed in a cold room (2-4 °C and 90-95% relative humidity for 12 days), post-salting (4-5 °C, 75-85% relative humidity for 60 days) and finally, the ripening period (14-20°C, relative humidity progressively reduced to 70% for 10 months).

Sample extraction and deproteinisation

Fifty grams of *Biceps femoris* muscle from the processed Spanish dry-cured hams, previously removed from their extramuscular fat, were minced and homogenised with 200 mL of 0.01N HCl in a stomacher (IUL Instrument, Barcelona, Spain) for 8 min in cold. The homogenate was centrifuged (12000g for 20 min at 4°C) and, after filtering through glass wool, the supernatant was deproteinised by adding 3 volumes of ethanol and maintaining the sample 20 h at 4°C. Then, the sample was centrifuged again (12000 g for 20 min at 4°C) and the supernatant was dried in a rotatory evaporator. Finally, the dried deproteinised extract was dissolved in

25 mL of 0.01 N HCl, filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and stored at -20°C until use.

Size-exclusion chromatography

An aliquot (5 mL) of the deproteinised extract from the Spanish dry-cured ham was subjected to size-exclusion chromatography in order to fractionate the peptides according to their molecular mass. For this purpose, a Sephadex G25 gel filtration column (2.5 x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 0.01 N HCl filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore), was employed. The separation was performed at 4°C using 0.01 N HCl as eluent, at a flow rate of 15 mL/h. The first 195 mL were discarded, and then 5mL fractions were collected using an automatic fraction collector and monitored by ultraviolet (UV) absorption at 214 nm (Agilent 8453 UV spectrophotometer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Fractions corresponding to elution volumes from 280 mL to 325 mL, that showed antioxidant activity in a previous work (Escudero et al., 2012) were pooled together, dried under vacuum and redissolved in 3 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in bidistilled water.

Reversed-phase high performance liquid chromatography

An aliquot (500 µL) of the redissolved pool of peptide fractions was injected into an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Tech.). The column used in this experiment was a Symmetry C18 (4.6x250 mm, 5µm) from Waters (Milford, MA, USA). Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.1% TFA in water and solvent B containing 0.085 % TFA in acetonitrile:water (60:40 v/v) . Both mobile phases A and B were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter and degassed prior to any analytical run. Peptides were first eluted with an isocratic gradient of 99% solvent A for 5 min, followed by a linear gradient from 1% to 100% of solvent B in 80 min at a flow rate of 0.8 mL/min. The separation was monitored using a diode

array detector at a wavelength of 214 nm and 0.8 mL fractions were collected and dried in a vacuum centrifuge. Then, dried collected fractions were redissolved in bidistilled water and assayed for antioxidant activity. Those fractions showing remarkable antioxidant activity were further analysed by Nano-LC/MS/MS mass spectrometry in order to identify the peptides.

Antioxidant activity

DPPH radical-scavenging assay

The DPPH radical-scavenging activity was determined as described by Bersuder, Hole and Smith (1998). 100 μ L of each peptide fraction or a 100 μ L aliquot of synthesized peptides at different concentrations (0.5-3 mg/mL) were mixed with 500 μ L of ethanol and 25 μ L of a DPPH solution (0.02% in ethanol). The mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature, and the reduction of DPPH radicals was measured at 517 nm. In its radical form, DPPH has an absorption band at 517 nm which disappears upon reduction by an antiradical compound. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical-scavenging activity. DPPH radical-scavenging activity was calculated as: DPPH radical-scavenging activity (%) = (Absorbance of control- Absorbance of sample)/ Absorbance control x 100. The control was conducted in the same manner than sample, except that bidistilled water was used instead of peptide sample. The test was carried out in triplicate.

Ferric-reducing antioxidant power (reducing power)

The reducing power was determined by measuring the ability to reduce ferric iron to ferrous iron (Huang, Tsai & Mau, 2006). Briefly, 500 μ L of each peptide fraction or synthesized peptide at different concentrations (0.16-1.00 mg/mL) were mixed with sodium phosphate buffer (500 μ L, 200 mM, pH 6.6) and potassium ferricyanide (500 μ L, 10mg/mL), after which the mixture was incubated at 50°C for 20 min. Then, trichloroacetic acid (500 μ L, 100 mg/mL) was added and the

mixture was centrifuged at 200 *g* for 10 min. The upper layer (1 mL) was then mixed with distilled deionised water (1 mL) and ferric chloride (200 μ L, 1 mg/mL), after which the absorbance at 700 nm was measured against a blank. Higher absorbance values were indicative of higher reducing power. The control was conducted in the same manner, except that bidistilled water was used instead of sample. The test was carried out in triplicate.

Peptide identification by tandem mass spectrometry

Identification of the sequence of peptides present in fractions exhibiting remarkable ACE inhibitory activity was carried out by nLC-MS/MS analysis. The peptide fractions were resuspended in 10 μ L of 0.1% TFA and cleaned/concentrated with ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to the nLC-MS/MS analysis according to the manufacturer recommendations. Peptides were eluted from ZipTip with 10 μ L of H₂O:ACN (50:50, v/v) and 0.1% of formic acid.

The nano-LC/ MS/MS analysis was performed in an Ultimate 3000 RSLC nano system from Dionex (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, UK) coupled to an Amazon ETD ion-trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ionization source (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Two μ L of ZipTip elution were injected into the LC-MS system by using the autosampler. Sample was pre-concentrated on a Dionex Acclaim[®] PepMap 100 column (100 μ m x 2 cm, C18, 5 μ m, 100A) (Dionex Corporation, LC Packings) at a flow rate of 4 μ L/min and using 0.1% of TFA as mobile phase. After 3 minutes of pre-concentration, the trap column was automatically switched in-line with a Dionex Acclaim[®] PepMap RSLC nano-column (75 μ m x 15cm, C18, 2 μ m, 100A) (Dionex Corporation, LC Packings). Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.1% formic acid in water, and solvent B, containing 0.1% formic acid in

100% acetonitrile. Chromatographic conditions were a linear gradient from 95 to 60% solvent A in 60 min at a flow rate of 0.250 $\mu\text{L}/\text{min}$ at 30 $^{\circ}\text{C}$.

Operating conditions for the ion trap mass spectrometer were positive polarity, capillary temperature of 200 $^{\circ}\text{C}$, capillary voltage of 4.5 V, and nitrogen was used as collision gas. First scan even was full MS scan from m/z value 100 to 1200.

Automated spectral processing and peak list generation was performed using Mascot Distiller v2.4.2.0 software (Matrix Science, Inc., Boston, MA) (<http://www.matrixscience.com>). The database search was done through Mascot Daemon software in combination with the Mascot interface 2.2 (Matrix Science, Inc., Boston, MA) (<http://www.matrixscience.com>). Matches of MS/MS spectra against sequences of the database were verified manually using Mmass software (Strohalm et al. 2010). BLAST was used as a basic local alignment search tool to find regions of local similarities between the identified peptides and the protein sequences of *Sus scrofa* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Peptide Synthesis

Antioxidant peptides identified in the Spanish dry-cured ham fractions were synthesized by the solid phase procedure using the Fmoc protected amino acid synthesis method in a Focus XC (aaptec[®], Louisville, KY, USA). The synthesized peptides were purified by HPLC on a C18 column using the conditions described before. The purity and the molecular mass of the purified peptide were determined in an Ultimate 3000 RSLC nano system from Dionex (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, UK) coupled to an AmaZon ETD ion-trap mass spectrometer equipped with an nanoelectrospray ionization source (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Purification and antioxidant activity of fractions obtained from dry-cured ham

Size-exclusion chromatography was employed to fractionate the water soluble peptide extract from dry-cured ham in the present study. Results from previous work (Escudero et al., 2012) revealed strong DPPH radical-scavenging activity in the elution zone between 220 and 345 mL (radical-scavenging activity from 39% to 92%). Also, in the present study, fractions eluting from 280 to 325 mL possessed high ferric-reducing antioxidant power as well as DPPH radical-scavenging activity (**Fig. 1**). Thus, these fractions (280-325 mL) were pooled together and afterwards separated by reversed-phase HPLC.

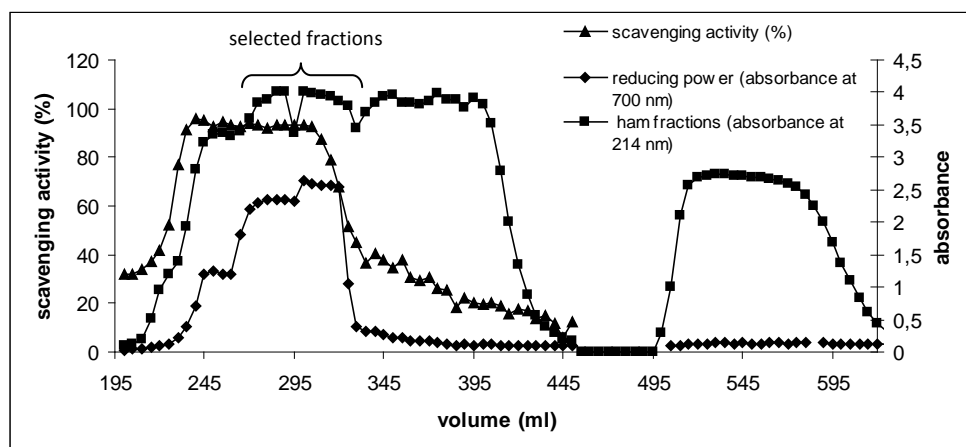


Figure 1. Fractionation of Spanish dry-cured ham extract in a Sephadex G-25 gel filtration column. Fractions were collected and assayed for DPPH radical-scavenging activity and for reducing power. Fractionation of dry-cured ham extract and DPPH radical-scavenging and reducing power assays were done in triplicate.

During separation (**Fig. 2**), 0.8 mL fractions were collected, dried and redissolved in 125 μ L of bidistilled water, assaying the radical-scavenging activity. Among all fractions collected, fractions eluting at 3, 4, 12 and 17 min exhibited the strongest DPPH radical-scavenging activity. Fraction eluted at 3 min showed an antioxidant activity of 87% and fractions at 4, 12 and 17 min showed antioxidant activity of

42%, 58% and 26%, respectively. Therefore, the fractions showing antioxidant activity were further analysed separately by mass spectrometry with the purpose of identifying and characterising their peptide sequences.

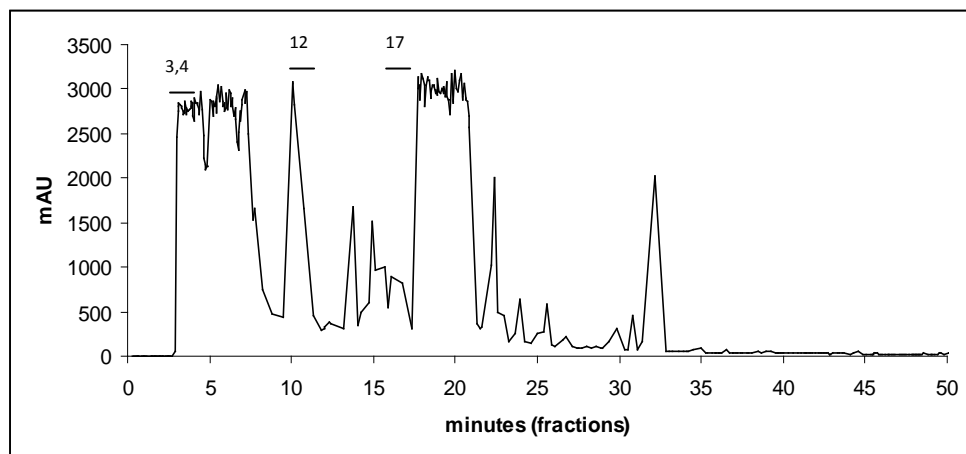


Figure 2. Reversed-phase chromatographic separation of the selected pooled fractions obtained from size-exclusion chromatography. Peak numbers indicate the collected fractions showing DPPH radical-scavenging activity. The chromatography was done in triplicate.

Identification of antioxidant peptides by tandem mass spectrometry

For the identification of antioxidant peptides, isolated fractions exhibiting DPPH radical-scavenging activity and obtained after reversed-phase chromatography were subjected to nano-LC/MS/MS in order to determine their respective molecular masses and sequences. A total of 27 peptide sequences were identified in the four fractions as reported in **Table 1**. This table lists the fractions in which the peptides were identified, the characterised amino acid sequences, the observed masses as well as the experimental and calculated masses. Seven peptides were identified in fraction 3, sixteen peptides were identified in fraction 4, seven peptides in fraction 12 and five peptides in fraction 17. All of them were originated from different sarcoplasmic proteins and collagen type VII alpha

Table 1. Identified peptides in fractions 3, 4, 12 and 17 from reverse-phase chromatography and showing radical-scavenging activity. The positioning of the fractions 3, 4, 12 and 17 in the elution profile is illustrated in Figure 1.

RP-HPLC fraction number	Peptide sequence	Observed (m/z)	Mr(expt) (m/z)	Mr(calce) (m/z)	Protein in <i>Sus scrofa</i>
3, 4	T.SGANP.P	444.99	443.99	445.18	zinc finger X-linked protein ZXDB-like T-complex protein 1 subunit zeta-2-like
4	H.NAAKL.R	515.19	514.18	515.31	LOW QUALITY PROTEIN: protein unc-80 homolog arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2-like probable RNA-binding protein 20 ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
4	L.GGSILI.G	559.24	558.23	558.34	tinin-like, partial methylcytosine dioxygenase TET2
4	T.NSGLM.P	539.19	538.18	537.21	LOW QUALITY PROTEIN: hephaestin-like cytosolic carboxypeptidase 1
3	C.QPSGN.L	502.41	501.41	502.20	activating transcription factor 7-interacting protein 1 phosphorylated CTD-interacting factor 1
4	Q.SAGNPN.Y	558.67	557.66	558.24	integrin alpha-3
3, 4	A.AAAAG.G	359.19	358.18	359.18	histone-lysine N-methyltransferase MLL2-like protocadherin Fat 3
3, 4	P.IHGSVVG.P	337.11	672.21	671.32	adenylate cyclase type 8-like H(+)/CK(-) exchange transporter 7-like isoform 1 guanylate cyclase soluble subunit alpha-2
17	W.ANTGA.A	434.38	433.37	433.18	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 (Fragment)
4	G.AEASTF.G	625.28	624.28	624.28	zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913-like isoform 2
12	K.ALGGA.G	388.04	387.03	387.21	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3-like PREDICTED: tudor domain-containing protein 6 zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913-like isoform 2
3	R.SNSPN.N	518.96	517.96	518.20	PREDICTED: uncharacterized protein C1orf101-like tuftelin-interacting protein 11
17	T.LVSGM.G	523.393	522.39	521.25	nucleoporin 210kDa DNA polymerase zeta catalytic subunit
17	D.QLAER.G	598.69	597.68	598.31	dystrophin
3, 4, 12	S.VPCEGY.N	666.77	665.76	666.27	centrosomal protein 152kDa
17	R.NVLVG.P	502.20	501.19	501.28	PREDICTED: hydrocephalus-inducing protein homolog, partial sodium bicarbonate cotransporter 3-like
4	K.MEYVS.E	628.40	627.39	627.26	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
4	P.SSAHT.S	502.18	501.17	501.22	microtubule-associated protein 1B protein WWC3-like aminoadipate-semialdehyde synthase
4	I.NVPSN.P	531.80	530.79	531.22	protocadherin-10-like zinc finger CCCH-type containing 14 peptidyl arginine deiminase-like protein
12	V.RVASC.S	535.52	534.51	534.26	protein transport protein Sec24B-like FTS and Hook-interacting protein-like SH2B adaptor protein 2 hypothetical protein LOC100622349
4	S.ETEYLG	636.30	635.29	635.28	putative ATP-dependent RNA helicase TDRD9-like
3, 4, 12, 17	R.REGIV.V	546.38	545.38	544.32	testis-expressed sequence 15 protein-like HEAT repeat containing 5B
4	E.PNSV.K	502.18	501.17	502.24	senataxin oxygen-regulated protein 1-like lysine-specific demethylase 6A-like lysine-specific demethylase 6A-like
12	S.TDSQA.Q	522.18	521.17	521.20	diacylglycerol kinase, eta
12	R.GLAGA.L	388.03	387.02	387.21	collagen, type VII, alpha 1
4	M.IAKLE.N	573.92	572.91	572.35	nesprin-2-like dynein heavy chain 12, axonemal-like small subunit processome component 20 homolog
4, 12	M.YGGAG.T	424.43	423.42	423.18	uncharacterized protein C20orf112 homolog
3, 4, 12, 17	S.ENNAS.F	516.62	515.61	516.18	A kinase (PRKA) anchor protein 6 AF4/FMR2 family, member 2 F-box only protein 39-like serine/threonine protein kinase MST4

protein (**Table 1**) were less than 1000 Da and had amino acid sequences between 5 and 7 amino acids in length. All the sequences of the peptides identified in this work were searched in Blast and revealed 100% homology with *Sus scrofa* skeletal muscle proteins. The formation of ROS and free radicals is unavoidable during oxidative metabolic processes. Free radicals which contain unpaired electrons can react rapidly with other groups or substances in the biosystem and attack key biological molecules such as DNA, proteins, and lipids leading to cell or tissue damages. Overproduction of free radicals is believed to be involved in many diseases (Harrison & Gongora, 2009; Muhammad, Bierhaus & Schwaninger, 2009; Rao, 2009). Therefore, antioxidants are important agents for protecting against oxidative stress. Many peptides have shown that the antioxidant activity is highly dependent on their sequence and the amino acid composition. The antioxidant activity of peptides is closely related to their molecular weight, amino acids constituents and sequences (Grimble, 1994). The lower the molecular weight of antioxidant peptide, the higher the chance that the peptide cross the intestinal barrier and exert biological effects (Roberts, Burney, Black & Zaloga, 1999). In fact, typical antioxidant peptides usually contain 2-20 amino acid residues per molecule. In this study, the molecular masses of the identified peptides were lower than 1000 Da, thus indicating that these peptides might have biological effects. On the other hand, it must be taken into account that the antioxidant activity of peptides is primarily related to the antioxidant activities of the amino acids present in the sequence. Thus, considering these aspects, some identified and characterised peptides were synthesized and their antioxidant activity determined. *In vitro* experiments were performed to determine DPPH radical-scavenging activity and ferric-reducing antioxidant power (reducing power), and the results showed that all the synthesized peptides possessed good *in vitro* antioxidant efficacy (**Fig.3** and **4**). The highest DPPH radical-scavenging activity was found to

be around 50% at a concentration of 3.0 mg/mL of peptides AAAAG, IHSGSVG, NVLVG and NAAKL (**Fig. 3 a and b**), being the peptide SAGNPN (**Fig. 3 a**) the most active presenting near 50% of antioxidant activity at a concentration of 1.5 mg/mL.

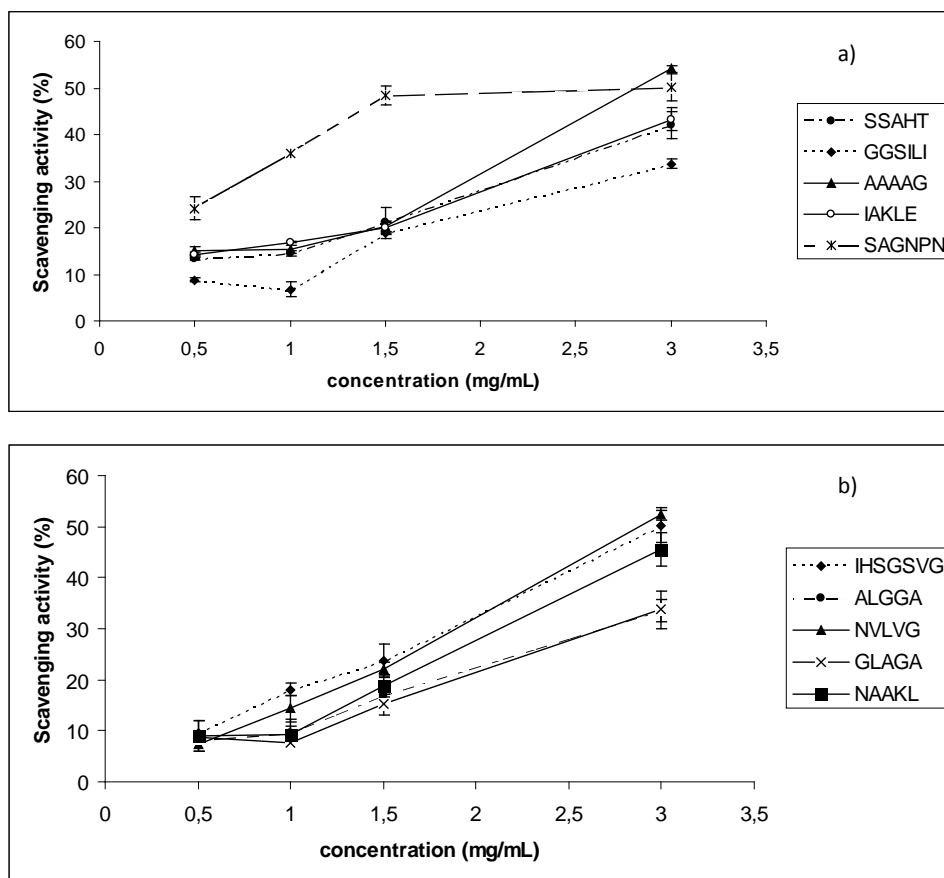


Figure 3. DPPH radical-scavenging activity of different concentrations of synthesized peptides (a and b). The values represent means of three independent experiments \pm S.D.

The other synthesized peptides showed a DPPH radical-scavenging activity around 30-40% at a concentration of 3 mg/mL. On the other hand, reducing power of the same peptides is shown in **Fig. 4 a and b**. In this assay, presence of antioxidants

peptides results in reducing the Fe^{3+} /ferricyanide complex to ferrous form and thus can be used to evaluate its potential antioxidant activity (Dorman, Peltoketo, Hiltunen, & Tikkanen, 2003).

Fig. 4 a and **b** show that the synthesized peptides exhibited dose-dependent increase in the reducing power.

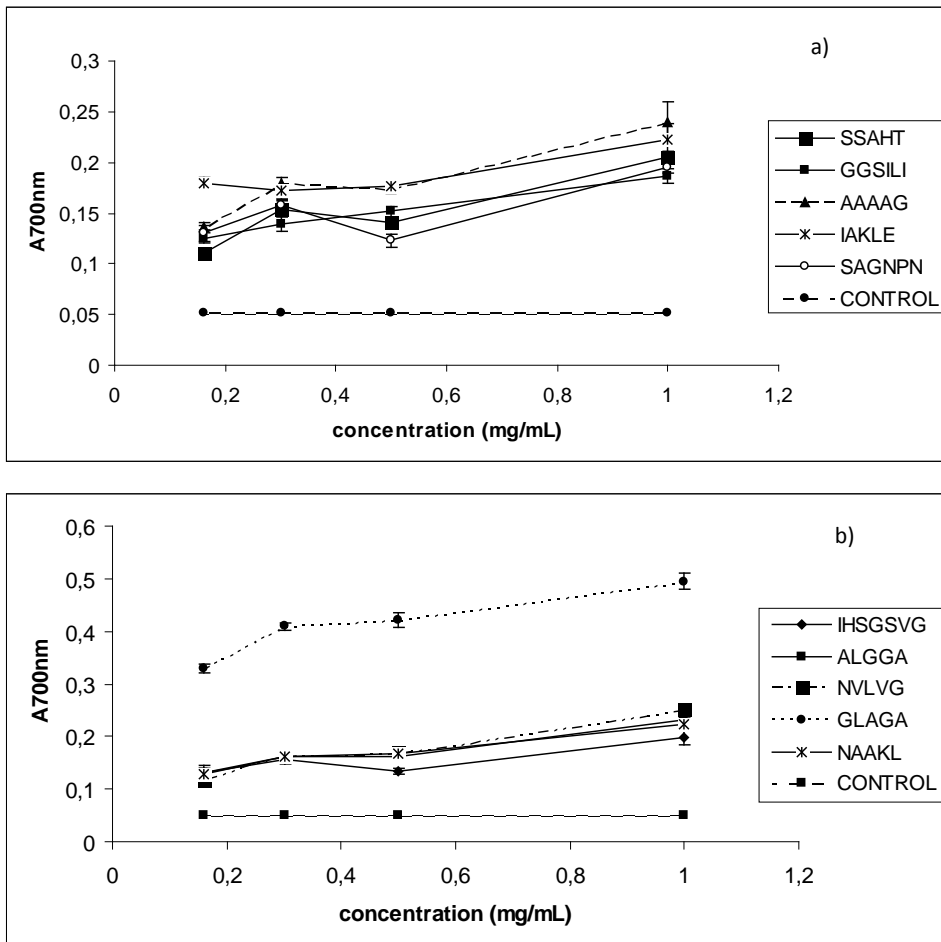


Figure 4. Reducing power of different concentrations of synthesized peptides (a and b). The values represent means of three independent experiments \pm S.D.

The same behavior is observed for their DPPH radical-scavenging activity. At the highest experimental concentration (1mg/mL), the reducing power of peptide GLAGA (**Fig. 4 b**) was around 0.5 units of absorbance, indicating that this peptide was the most active in relation to reducing power. The other synthesized peptides were in the range of 0.15-0.25 units, which is much higher than the 0.08-0.25 reported for higher concentrations (5mg/mL) of hydrolysates prepared from other sources (Chang, Wu & Chiang, 2007). Thus, the results show that dry-cured ham potentially contains peptides with reducing power and also peptides that potentially are electron donors and neutralize free radicals to convert them to more stable products and terminate the radical chain reaction.

The relationship between antioxidant ability and the aminoacid constituents has been reported previously (Grimble, 1984). In this sense, it has been reported that the presence of hydrophobic amino acids and one or more residues of H, P, C, Y, W, F or M might enhance the antioxidant activity in peptides (Ren, Zhao, Shi, Wang, Jiang & Cui, 2008). In the sequences of our identified peptides and some of the synthesized peptides some of these amino acids are present, which is very important to the radical-scavenging activity due to their ability to quench unpaired electrons or radicals by supporting protons (Qian, Jung, Byun & Kim, 2008; Quian, Jung & Kim, 2008)

Histidine (H) is very important to the radical scavenging activity of peptides due to their special structural characteristics. Some studies with peptides containing H have demonstrated that they can act as metal ion chelators, active-oxygen quencher, and hydroxy radical scavenger (Chen, Muramoto, Yamauchi & Nokihara, 1996). Peptides SSAHT and IHSGSVG (**Table 1**) have H in their sequences. This amino acid may have contributed to the observed antioxidant activity.

The V residues present in the synthesized peptides IHSGSVG, NVLVG and some of the identified peptides (**Table 1**) may have contribute to its radical scavenging activity (You, Zhao, Regenstein & Ren, 2010).

Proline (P) was present in peptide SAGNPN, that showed high radical scavenging activity (**Fig. 3 a**) as well as in other identified peptides (**Table 1**). On the other hand, many synthesized peptides like GGSILI, IAKLE, ALGGA, NVLVG, GLAGA and NAAKL possessed leucine (L) residues. The presence L may have possibly contributed to the antioxidant activities of peptides identified in the present study (Hsu, 2010; You et al., 2010).

Alanine (A) and glicine (G) were previously found in the sequences of antioxidant peptides (Hsu, 2010; Rajapakse, Mendis, Byun & Kim, 2005). In the sequences of peptides identified in this study large quantities of these two amino acids were present (**Table 1**).

The antioxidant fractions 3, 4, 12 and 17 from RP-HPLC, which showed the highest antioxidant activities were eluted in the first 20 min, demonstrating that these peptides were hydrophilic. Sacchetti, Di Mattia, Pittia and Martino (2008) studied the antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic fractions from chicken meat and they reported that the hydrophilic fraction showed higher antioxidant activity that the lipophilic fraction.

The results of this study suggest that Spanish dry-cured ham could constitute a good source of peptides with antioxidant activity. The presence of certain specific amino acids in the sequences of the identified peptides could contribute to their antioxidant activity.

CONCLUSION

In conclusion, our study reports for the first time the antioxidant activity of peptides derived from Spanish dry-cured ham. A total of 27 novel peptides were sequenced by LC-MS/MS and some of them were also synthesized to confirm their identity and ascertain properties. Among the synthesized peptides, the most potent peptide displaying the highest radical scavenging activity was identified to be SAGNPN, while the peptide GLAGA exhibited the highest reducing power. The presence of some amino acids, namely H, P, V, L, A and G may explain the antioxidant activities observed for the identified and synthesized peptides. The results suggest the presence of several peptides in the dry-cured ham with potent antioxidant properties conferred by different mechanisms. Although it is difficult to compare the antioxidant capacity with the reported data due to the diversity of methodologies used, Spanish dry-cured ham seems to be a good potential source of antioxidant peptides.

ACKNOWLEDGEMENTS

FPI Scholarship from Spanish Ministry of Science and Innovation to E.E., grants AGL2007-65379-C02-01 and AGL2010-16305 from Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER funds are fully acknowledged. HEFCE infrastructure funding is acknowledged for MS equipment to P.D.F. L.M and P.D.F are grateful to the EU-FP7 Marie Curie IEF scheme (FOOSAF project) for financial resources.

LITERATURE CITED

Aristoy, M.C & Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In : Charalambous G., editor. *Food flavors: Generation, analysis and processes influence*. Amsterdam: Elsevier Science. p 1323-44.

Bersuder, P., Hole, M. & Smith, G. (1998). Antioxidants from heated histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75, 181-187.

Chang, C.Y., Wu, K.C. & Chiang, S.H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine hemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100, 1537-1543.

Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2619-2623.

Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. & Ordóñez, J.A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. *Meat Science*, 46, 115-128.

Di Bernardini, R., Rai, D.K., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen A.M., Harnedy, P. & Hayes, M. (2011). Isolation, purification and characterisation of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. *Peptides*, 32, 388-400.

Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M.J. (2003). Characterization of the antioxidant properties of deodorized aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs. *Food Chemistry*, 83, 255-262.

Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K., Toldrá, F. (2012) Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 91, 306-311.

Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. & Toldrá, F. (1999). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 578-584.

Gardner, M.L.G. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual Review of Nutrition*, 8, 329-50.

Gardner, M.L.G. (1998). Transmucosal passage on intact peptides in mamalian metabolism. In: Grimble, G.K., Backwell, F.R.G., editors. Tissue utilization and clinical targeting. London: Portland Press Ltd.

Grimble, G.K. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14, 419-447.

Harrison, D.G., Gongora, M.C. (2009). Oxidative stress and hypertension. *Medical Clinics of North America*, 93, 621-635.

Hsu, K.C. (2010). Purification of antioxidant peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122, 42-8.

Huang, S.J., Tsai, S.Y. & Mau, J.L (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindrea*. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 378-386.

Lee, S.J., Kim, E.K., Hwang, J.W., Oh, H.J., Cheong, S.H., Moon, S.H., Jeon, B.T., Lee, S.M. & Park, P.J. (2010). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, 123, 216-220.

Liu, R., Wang, M., Duan, J., Guo, J. & Tang, Y. (2010). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu Bubali* (water buffalo horn). *Peptides*, 31, 786-793.

Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3228-34.

Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. (2009). Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in spanish dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8982-88.

Muhammad, S., Bierhaus, A. & Schwaninger, M. (2009). Reactive oxygen species in diabetes-induced vacular damage, stroke, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 16, 775-785.

Quian, Z.J., Jung, W.K., Byun, H.G. & Kim, S.K. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster. *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*, 99, 3365-3371.

Pham-Huy, L.A., He, H. & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89-96.

Quian, Z.J., Jung, W.K. & Kim, S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690-8.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. & Kim, S.K. (2005). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 16, 562-569.

Rao, K.S. (2009). Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46, 9-15.

Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y. & Cui, C. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108, 727-736

Ren, J., Zheng, X., Liu, X. & Liu, H. (2010). Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 519-523.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-7.

Roseiro, L.C., Santos, C., Sol, M., Borges, M.J., Anjos, M., Gonçalves, H. & Carvalho, A.S. (2008). Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science*, 79, 784-794.

Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P. & Martino, G. (2008). Application of a radical scavenging activity test to measure the total antioxidant activity of poultry meat. *Meat Science*, 80, 1081-5

Saiga, A., Tanabe, S. & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3661-3667.

Strohalm M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V. (2010). mMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry*, 82, 4648-51.

Toldrá, F. & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 331-352.

Toldrá, F., Aristoy, M.C. & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33, 181-185.

Toldrá, F. & Reig, M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 517-522.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. & Ren, J. (2010) Purification and identification of antioxidant peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, 43, 1167-73.

Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. & Jiang, Y.M. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 4, 1658-1663.

Wang, J.Z., Zhang, H., Zhang, M., Yao, W.T., Mao, X.Y. & Ren F.Z. (2008). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 693-707.

IV. Discusión general

IV. Discusión general

Durante el proceso de elaboración del jamón curado tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas, entre las que se encuentra la proteólisis (Todr  y Flores, 2008; Toldrá, 1998). El resultado de esta proteolisis que es muy intensa y que afecta tanto a las proteínas miofibrilares como a las proteínas sarcoplásmicas, resulta en una importante acumulación de péptidos pequeños (Mora, 2009; Sentandreu et al., 2003) y aminoácidos libres (Sforza et al., 2001; Toldrá et al., 2000) de gran importancia por su contribución tanto directa como indirecta al aroma, sabor y calidad final del jamón.

Aunque se tiene evidencia de la presencia de numerosos péptidos de mayor o menor tamaño al final del proceso del curado del jamón, se sabe muy poco sobre sus secuencias en aminoácidos y del efecto que pueden tener sobre la salud humana. En este sentido, los péptidos pueden regular diferentes procesos en el organismo ejerciendo un impacto positivo en algunas funciones del cuerpo que pueden tener una importante influencia en la salud (Kitts y Weiler, 2003; Rutherford-Marwick y Mougham, 2005).

Los péptidos biológicamente activos han sido aislados de alimentos de distinta naturaleza, como por ejemplo, leche, soja y huevo (Pihlanto y Korhonen, 2003). A estos péptidos se les han atribuido propiedades antimicrobianas, antihipertensivas (efecto inhibidor de la ECA), capacidad para disminuir el colesterol o efectos antioxidantes, entre otros, que en muchas ocasiones pueden ser beneficiosas para la salud (Hartman y Meisel, 2007). Estos péptidos bioactivos están inactivos dentro de la secuencia que forma parte de la proteína, pero pueden ser liberados durante la hidrólisis enzimática de las proteínas y así ejercerán su actividad biológica (Korhonen, 2009).

Los péptidos más estudiados aquellos con actividad inhibidora de la ECA y que por tanto evitan la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor que contribuye al aumento de la presión arterial. Por lo tanto, sustancias que inhiban la ECA contribuirían o serían capaces de reducir la presión sanguínea (Houston, 2002).

Hay diversos estudios en los que se pone de manifiesto que tras la hidrólisis de las proteínas de carne de cerdo se generan péptidos inhibidores de la ECA (Arihara et al. 2001; Katayama et al., 2003). De entre estos procesos de hidrólisis, la digestión humana simulada *in vitro* generó péptidos con dicha actividad que produjeron un efecto antihipertensivo cuando se administraron a ratas espontáneamente hipertensas (Escudero et al., 2010; Escudero et al., 2012). Otro ejemplo sería el de algunos péptidos derivados de la acción de las dipeptidilpeptidasas musculares durante el proceso de curado del jamón y que fueron capaces de inhibir la ECA en pruebas *in vitro* (Sentandreu et al., 2007).

Ante la evidencia de la presencia de péptidos bioactivos en productos derivados de la carne de cerdo como es el jamón curado, en esta tesis se investigó la presencia de actividad inhibidora de la ECA en fracciones peptídicas obtenidas de dicho producto. También se estudió el efecto que producían en la presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas la administración de las fracciones peptídicas que poseían dicha actividad. El resultado fue que las fracciones peptídicas que mostraron actividad inhibidora *in vitro* también mostraron actividad antihipertensiva *in vivo* con una disminución muy acusada (una disminución de hasta 38.3 mmHg con respecto del control cuando se administró 4.56 mg de extracto peptídico/kg de peso de rata) de la presión sistólica en las ratas. En este sentido, Arihara y Ohata (2008) ya observaron una actividad inhibidora de la ECA en extractos de jamón curado. La actividad antihipertensiva encontrada en las fracciones de jamón curado ha resultado muy

superior a la que se describió en estudios realizados con hidrolizados de carne de cerdo administrados a ratas espontáneamente hipertensas donde, tras administrar 10 mg de hidrolizado/kg de peso de rata, la presión sistólica de la misma disminuía alrededor de 15 mm Hg con respecto del control (Ahmed et al., 2009). En alimentos distintos de carne de cerdo, como por ejemplo hidrolizados de caseína de la leche, también se han realizado diversos estudios en los que se administraba a ratas hipertensas 300 mg de hidrolizado de caseína/ kg de peso de rata observándose una disminución de presión sistólica de alrededor de 20 mm Hg (Jiang et al., 2010). Así pues, los resultados obtenidos en las fracciones peptídicas del jamón curado ponen de manifiesto el gran potencial de este producto para disminuir la presión sanguínea sistólica en comparación con otras fuentes proteicas.

Una deficiencia en el organismo de la actividad antioxidante también se ha relacionado con casos de hipertensión y con otras enfermedades como el cáncer, diabetes, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (Sainz et al., 2012; Dowling y Head, 2012; Renata et al., 2012). En este sentido, diversos estudios han puesto de manifiesto que hidrolizados de proteínas de diferentes alimentos tenían capacidad antioxidante (Sakanaka et al., 2004; Torruco-Uco et al., 2009). Además, se han encontrado péptidos con actividad antioxidante en hidrolizados de varias proteínas de alimentos tales como proteínas de girasol u hojas de alfalfa (Chen et al., 1995; Ren et al., 2010;). Sin embargo, hay muy poca información relativa a la generación de péptidos antioxidantes en productos cárnicos, incluyendo al jamón curado. Así pues, se investigó la actividad antioxidante de las mismas fracciones peptídicas del jamón para las que se realizaron ensayos de actividad antihipertensiva. Como actividad antioxidante se consideró la actividad secuestradora del radical DPPH y la capacidad para erradicar el ión superóxido. Para la actividad secuestradora del DPPH se obtuvieron valores de actividad

antioxidante de entre el 39% y el 92% según las fracciones peptídicas ensayadas, así como valores de habilidad para erradicar el ión superóxido de entre el 41% y el 50%, sugiriendo esto la presencia de péptidos con actividad antioxidante. Estos resultados son comparables a los obtenidos en otros estudios realizados en hidrolizados de hemoglobina porcina con valores que oscilaban entre el 54% y el 84% de actividad secuestradora del radical DPPH (Sun et al., 2012). En otro estudio (Saiga et al., 2003) realizado con hidrolizados de proteínas miofibrilares de cerdo se obtuvieron resultados de alrededor del 30% de esta misma actividad, resultados que están claramente por debajo de los que se han obtenido en nuestro estudio.

Estos resultados ponen de manifiesto que el jamón curado contiene péptidos capaces de ejercer un notable efecto tanto de actividad antihipertensiva como actividad antioxidante.

Con el fin de identificar los péptidos responsables de la actividad detectada, se procedió a su aislamiento y secuenciación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, a partir de las fracciones que habían mostrado actividad antihipertensiva e inhibidora de la ECA. Así, fueron identificados un total de 79 secuencias de péptidos presentes en dichas fracciones del extracto de jamón curado. Estos péptidos identificados provienen de diferentes proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas del músculo de la carne de cerdo. Además, los péptidos identificados tenían un peso molecular comprendido entre 374 y 1609, con secuencias de entre 5 y 14 aminoácidos. La actividad biológica de los péptidos inhibidores de la ECA y antihipertensivos está relacionada con la composición en aminoácidos, la secuencia, tamaño y configuración (Matsui y Matsumoto, 2006). Los resultados obtenidos en esta experiencia concuerdan con el hecho de que los péptidos inhibidores de la ECA normalmente presentan entre 2 y 12 aminoácidos en su secuencia (Yamamoto et

al., 1994) con pesos moleculares entre 150 y 800 (Zhang et al., 2009). Considerando este hecho, junto con los requerimientos estructurales y de secuencia para ser péptidos inhibidores de la ECA y antihipertensivos explicados en apartados anteriores de esta tesis doctoral, se seleccionaron determinados péptidos identificados que fueron sintetizados y su inhibición de la ECA calculada en forma de IC_{50} . Estos péptidos presentaron en mayor o menor medida inhibición de la ECA (capítulo 2), resultando el péptido AAATP el que mayor inhibición mostró. Además, este péptido disminuyó la presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas. El efecto antihipertensivo del péptido AAATP se observó al administrar a las ratas 1mg de péptido/kg de peso, de manera que la presión sistólica sufrió una bajada de 25.6 mmHg ($p < 0.05$) a las 8h postadministración en comparación con el grupo control. Los resultados presentados en esta tesis doctoral muestran valores similares o incluso mucho más elevados que estudios previos realizados con péptidos sintéticos derivados de la carne de cerdo y/u otras fuentes proteicas. Por ejemplo, Nakashima et al. (2002) estudió el efecto antihipertensivo de dos pentapéptidos obtenidos tras la hidrólisis con termolisina de miosina del músculo de cerdo, mostrando estos péptidos una reducción de presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas de entre 21 y 23 mm Hg. Por otro lado, Yokohama et al. (1992) administró 60 mg/kg de peso de rata de un pentapéptido obtenido tras la hidrólisis con termolisina de músculo de bonito produciendo una bajada de presión arterial sistólica de 23 mm Hg. En otro estudio, Kawasaki et al. (2000) administró 10mg/Kg de peso de rata de un dipéptido obtenido tras la hidrólisis con alcalasa de músculo de sardina produciendo una pequeña bajada de presión sistólica de 7 mm Hg. Por lo tanto, nuestro estudio demostró que el péptido AAATP puede reducir de una manera más efectiva que otras fuentes proteicas la presión sanguínea sistólica. Los péptidos que mostraron una débil inhibición de la

enzima se encontraban, sin embargo, en fracciones que presentaron un efecto antihipertensivo *in vivo*. Esto refuerza lo indicado en estudios previos de que no siempre existe una correlación entre la actividad inhibidora de la enzima *in vitro* e *in vivo* (Hartmann y Meisel, 2007; Lopez-Fandiño et al., 2006). También ha sido descrito que puede existir un efecto sinérgico entre varios péptidos a la hora de presentar inhibición de la ECA (Li et al., 2004).

Por otro lado, se purificaron e identificaron los péptidos presentes en las fracciones del extracto soluble de jamón curado y que presentaron actividad antioxidante en el capítulo 1. Un total de 27 secuencias de péptidos fueron identificadas en las fracciones obtenidas del extracto de jamón y que habían mostrado previamente actividad secuestradora del radical DPPH. La identificación se realizó una vez más por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Estos péptidos identificados se originaron de diferentes proteínas sarcoplásmicas y colágeno. Su peso molecular fue en todos los casos menor a 1000 Da y presentaron secuencias de entre 5 y 7 aminoácidos.

Como se explicó anteriormente, los antioxidantes son agentes muy importantes para protegernos del estrés oxidativo. Muchos péptidos han mostrado que su actividad antioxidante es muy dependiente de su secuencia, de la composición en aminoácidos y del peso molecular (Grimble 1994). Cuanto menor sea el peso molecular del péptido y por lo tanto, menos aminoácidos (entre 2 y 20 residuos) tenga, mayor será la oportunidad que tengan para cruzar intactos la barrera intestinal y ejercer su efecto biológico (Roberts et al., 1999). Los péptidos identificados en este estudio (capítulo 3) estarían en concordancia con lo mencionado anteriormente. Por lo tanto, cabría esperar que estos péptidos ejercieran un efecto biológico. Además, hay que tener en cuenta también que la actividad antioxidante de péptidos está muy relacionada con la actividad antioxidante de los aminoácidos presentes en la secuencia. En este sentido, los

péptidos identificados contienen en su secuencia uno o más residuos de determinados aminoácidos como, por ejemplo, histidina, prolina, tirosina, metionina, triptófano, que se sabe favorecen la actividad antioxidante por diferentes mecanismos (Quian et al., 2008). Considerando todos estos aspectos, se escogieron aquellos péptidos que cumplieran con los criterios de secuencia, tamaño y composición en aminoácidos y se sintetizaron por el procedimiento de fase sólida utilizando el método de síntesis FMOC.

Con los péptidos sintetizados se realizaron ensayos para determinar la actividad secuestradora del DPPH y el poder reductor (capítulo 3) y los resultados mostraron que todos los péptidos sintetizados poseían buena eficacia antioxidante *in vitro*. La capacidad antioxidante más fuerte fue observada para el péptido SAGNPN que mostró una actividad antioxidante del 50% a una concentración de 1.5 mg/mL de péptido. Hidrolizados de proteína de cacahuete han mostrado actividad secuestradora del DPPH a esa misma concentración con valores muy inferiores (entre el 20% y 40% de actividad) (Jamdar et al., 2010) Por otro lado, el péptido GLAGA mostró elevado poder reductor con 0.5 unidades de absorbancia a 700 nm a una concentración de 1 mg/mL de péptido. Este valor es mucho más elevado que otros valores encontrados en hidrolizados de hemoglobina porcina a concentraciones mucho más elevadas (Chang et al., 2007). Así pues, puede afirmarse que el jamón curado contiene péptidos con poder reductor y péptidos que son donadores de electrones y que neutralizan los radicales libres para convertirlos en productos más estables. Aunque es difícil comparar la capacidad antioxidante con estudios publicados dada la diversidad de metodologías empleadas para determinar dicha capacidad, el jamón curado podría considerarse una potencial fuente de péptidos antioxidantes.

Los resultados presentados en esta tesis son coherentes con resultados hallados en algunos estudios epidemiológicos en los que el consumo de jamón curado no

se asociaría a un mayor riesgo cardiovascular y de hipertensión arterial (Ruiz-Canela López et al., 2009), ya que la presencia natural de péptidos bioactivos en el jamón curado podrían contrarrestar los posibles efectos adversos del contenido en sodio. Así pues, el jamón curado podría considerarse un alimento recomendable dentro del patrón de dieta mediterránea.

Bibliografía

- Ahhmed, M.A., Kawahara, S., Muguruma, M. (2009). Transglutaminase improves the textural and structural properties of chicken skeletal, smooth, and cardiac muscles. *Proceeding of the 55th International Congress of Meat Science and Technology. (PE 426), 16th-21st August, 2009. Copenhagen, Denmark.*
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science, 57*, 319-324.
- Arihara, K. & Ohata, M. (2008). Bioactive compounds in meat. In F. Toldrá (Ed.), *Meat biotechnology* (pp. 231-249). New York: Springer.
- Chang, C.Y., Wu, K.C. & Chiang, S.H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine hemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry, 100*, 1537-1543.
- Chen, H. M., Muramoto, K. & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43*, 574-578.
- Dowling, A.L.S., Head, E. (2012). Antioxidants in the canine model of human aging. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1822*, 685-689.
- Escudero, E., Sentandreu, M. A, Arihara, K. & Toldrá, F. (2010). Angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 2895-2901.
- Escudero, E., Toldrá, F., Sentandreu, M.A., Nishimura, H., Arihara, K. (2012). Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Meat Science, 91*, 382-384.
- Grimble, G.K. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition, 14*, 419-447.
- Hartman, R. & Meisel, H. (2007). Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, 18*, 163-169.
- Houston, M. C. (2002). The role of vascular biology, nutrition and nutraceuticals in the prevention and treatment of hypertension. *Journal of the American Nutraceutical Association* (suppl. No.1), 1-71.

- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peaut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121, 178-184.
- Jiang, Z., Tian, B., Brodtkorb, A., 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.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. & Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Animal Science Journal*, 74, 53-58.
- Kawasaki, T., Seki, E., Osajima, K., Yoshida, M., Asada, K., Matsui, T., Osajima, Y. (2000). Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *Journal of Human Hypertesion*, 14, 519-523.
- Kitts, D. D. & 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. J. (2009). Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 64, 16-25.
- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research (N.Y.)*, 24: 469-486.
- Lopez-Fandino, R., Otte J. & 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.
- Matsui, T., Matsumoto, K. Antihypertensive peptides from natural resources. *Advances in Phytochem*, 2006; 255-271
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F. & Bramley, P. M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3228-3234.
- Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Mio, H., Ishikawa, S., Itoh, M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science*, 67, 434-437.

Pihlanto, A. & Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175-276.

Quian, Z.J., Jung, W.K. & Kim, S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana Shaw*. *Bioresource Technology*, 99, 1690-8.

Quian, Z.J., Jung, W.K., Byun, H.G. & Kim, S.K. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster. *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*, 99, 3365-3371

Ren, J., Zheng, X. Q, Liu, X. L. & Liu, H. (2010). Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 519-523.

Renata, A., Soriano, S., Pastora, G.M. (2012). Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 46, 378-386.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-7.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-7.

Ruiz-Canela López, M., Bes-Rastrollo, M., Zazpe, I., Alfredo Martínez, J. Cuervo, M., Martínez-González, M.A. (2009). Consumo de jamón curado e incidencia de episodios cardiovasculares, hipertensión arterial o ganancia de peso. *Medicina Clínica*, 133, 574-80.

Rutherford-Marwick, K.J., Mougham, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88, 955-966.

Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine miofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3661-3667.

Sainz, R.M., Lombo, F., Mayo, J.C. (2012). Radical decisions in cancer: Redox control of cell growth and death. *Cancers*, 4, 442-474.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. & Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86, 99-103.

- Sentandreu, M. A & Toldrá, F. (2007). Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chemistry*, *102*, 511-515.
- Sentandreu, M. A, Aristoy, M. C., Toldrá, F., Stoeva, S., Laib, K. & Voelter, W. (2003). Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science*, *68*, 64-69.
- Sforza, S., Pigazzani, A., Motti, M., Porta, C., Virgili, R., Galaverna, G., Dossena, A. & Marchelli, R. (2001). Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity. *Food Chemistry*, *75*, 267-273.
- Sun, Q., Luo, Y., Shen, H., Li, X., Yao, L. (2012). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide from porcine haemoglobin hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*, 148-154.
- Toldrá, F. & Flores, M. (2008). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*, 331-352.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, *49*, (Suppl. 1), S101-S110.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C. & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, *33*, 181-185.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Davila-Ortiz, & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, *42*, 1597-1604.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal Dairy Science*, *77*, 917-922.
- Yokohama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *56*, 1541-1545.
- Zhang, F., Wang, Z., Xu, S. (2009). Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with in vitro angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability. *Food Chemistry*, *117*, 387-392.

V. Conclusiones

V. Conclusiones

-Se ha estudiado el efecto antihipertensivo del jamón curado observándose que ciertas fracciones peptídicas del extracto soluble del mismo presentan una elevada actividad antihipertensiva *in vivo* e *in vitro*. Los ensayos *in vitro* para estas fracciones revelaron una actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) de hasta el 80% y una actividad *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas resultante en un descenso de presión sanguínea sistólica de 38.38 mm Hg. Se han identificado en dichas fracciones, por primera vez, un total de 79 secuencias de péptidos los cuales provienen de la hidrólisis de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas. Entre todos ellos, el péptido más destacado fue AAATP que presenta un valor IC_{50} de 100 μ M, así como un efecto antihipertensivo de descenso de presión sanguínea sistólica de 25.6 mmHg a las 8h de haber sido administrado a ratas espontáneamente hipertensas.

-Otras fracciones peptídicas presentaron actividad antioxidante, mostrando valores de actividad secuestradora del radical DPPH de hasta el 92%, así como habilidad para erradicar el ión superóxido de hasta el 50 %. De estas fracciones se consiguieron identificar 27 péptidos, de entre los que destacó el péptido SAGNPN con una actividad antioxidante del 50%. Además, el péptido GLAGA mostró elevado poder reductor. El resto de péptidos que se ensayaron para la actividad antioxidante mostraron también actividad pero en menor medida. Estos resultados evidencian la presencia de péptidos en jamón curado con propiedades antioxidantes.

-Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el jamón curado contiene péptidos relevantes que presentan actividad antihipertensiva y antioxidante. La combinación de estas bioactividades hace del jamón curado una excelente fuente de compuestos bioactivos que podrían ayudar a mejorar la salud cardiovascular del consumidor.

Anexo

Nomenclatura de aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

