

CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS GENERADOS EN LA DIGESTIÓN *IN VITRO* DE LA CARNE DE CERDO.

Elizabeth Escudero¹, Miguel Ángel Sentandreu¹, M^a Concepción Aristoy¹ y Fidel Toldrá¹

RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo ha sido identificar y caracterizar los péptidos generados en la simulación de la digestión gastrointestinal de la carne de cerdo (*Longissimus dorsi*) mediante la acción secuencial de las enzimas pepsina y pancreatina. El hidrolizado resultante fue analizado mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray (nanoLC-ESI-MS/MS). El uso de esta técnica nos permitió identificar en el hidrolizado cincuenta y un péptidos diferentes, pertenecientes a las principales proteínas estructurales del músculo y a algunas proteínas sarcoplásmicas más abundantes. Hasta donde se conoce, esta identificación constituye el número más elevado de péptidos identificados en digeridos de carne de cerdo. Los fragmentos identificados presentan un tamaño que abarca desde los seis a los dieciséis amino ácidos, siendo muy abundantes los residuos de prolina, lo que confiere a estos péptidos mayor resistencia a una posterior degradación por las enzimas digestivas. El presente estudio constituye una clara evidencia de la extensiva degradación que las proteínas del músculo de cerdo sufren durante la digestión gastrointestinal, resultando en una amplia variedad de péptidos de pequeño tamaño. Se puede afirmar por tanto, que la simulación *in vitro* de la digestión de la carne de cerdo unido a la identificación de los péptidos mediante técnicas de proteómica, constituye una vía adecuada para conocer mejor la generación de péptidos provenientes de una dieta rica en proteínas de alta calidad.

Palabras clave: digestión de proteínas, carne de cerdo, músculo esquelético, péptidos, espectrometría de masas.

¹ Departamento de Ciencia de la carne, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avd. Agustín Escandino, 7. 46980, Paterna (Valencia). Telf. 963900022 Ext. 2112

El principal objectiu d'aquest treball ha estat identificar i caracteritzar els pèptidos generats en la simulació de la digestió gastrointestinal de la carn de porc (*Longissimus dorsi*) mitjançant l'acció seqüencial dels enzims pepsina y pancreatina. L'hidrolitzat resultant va ser analitzat per cromatografia líquida acoplada a un espectròmetre de masses quadrupòl TOF equipat amb una font d'ionització per nanoelectrospray (nanoLC-ESI-MS/MS). L'ús d'aquesta tècnica ens va permetre identificar en l'hidrolitzat cinquanta-un pèptidos diferents. Aquests fragments van correspondre a les principals proteïnes estructurals del muscle i algunes proteïnes sarcoplàsmiques molt conegudes. Fins a on es coneix, aquesta identificació constituïx el nombre més elevat de pèptidos identificats en digerits de carn de porc. Els fragments d'aquests pèptids són d'una grandària que comprén de sis a setze aminoàcids, sent molt abundants els residus de prolina, fet que fa aquests pèptids més resistents a una posterior degradació per part dels enzims digestius. El present estudi constituïx una clara evidència de l'extensiva degradació que les proteïnes del muscle de porc sofriren després de la digestió gastrointestinal, originant una àmplia varietat de pèptids de tamany menut. Per tant, la simulació en laboratori de la digestió *in vitro* contribuïx a un millor coneixement de la generació de pèptidos provinents d'una dieta rica en proteïnes d'elevada qualitat.

The main objective of this work was to identify and characterize the peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of pork meat (*Longissimus dorsi*) by the sequential action of pepsin and pancreatin. The obtained hydrolysate was analyzed by liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ionization source (nanoLC-ESI-MS/MS). Using this technique fifty one different peptides were identified in the hydrolysate, corresponding to fragments of the main structural muscle proteins and some well known sarcoplasmic proteins. To the best of our knowledge, this constitutes the highest number of peptides identified in pork meat digests. Peptide fragment size ranged from six to sixteen amino acids, being rich in proline residues and thus making them more resistant to further degradation by digestive enzymes. The present study constitutes a clear evidence of the extensive degradation that pork muscle proteins would undergo after gastrointestinal digestion, giving rise to a wide variety of short peptides. So, the use of *in vitro* digestion contributes to a better knowledge about the generation of peptides from diets with high protein quality.

INTRODUCCIÓN

La carne constituye una fuente nutricional de proteínas de alta calidad (Hoffman, 1993). De hecho, estas proteínas han sido consideradas una importante fuente de aminoácidos esenciales y nitrógeno orgánico. Las proteínas más importantes de la carne incluyen proteínas estructurales tales como la actina o la miosina. Las proteínas de la carne contienen aminoácidos que no se encuentran de manera habitual en proteínas de plantas, como por ejemplo la metilhistidina y la hidroximetil lisina (Friedman, 1996). La calidad de la proteína ingerida va a depender de la composición y concentración en aminoácidos esenciales y también de la capacidad del organismo para absorber dichos aminoácidos y péptidos generados durante el proceso digestivo (Savoie et al., 2005). Más recientemente, se han propuesto otros parámetros para establecer el valor de las proteínas de la dieta, como son la eficacia de la digestión de las proteínas (Savoie et al., 2005; Dangin et al., 2002) o el concepto de péptidos derivados de proteínas que muestran actividad biológica, como por ejemplo actividad antihipertensiva, antitrombótica, opioide, inmunomoduladora, antimicrobiana o antioxidante (Kitts y Weiler, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2003). Las secuencias de péptidos bioactivos están presentes en muchas de las proteínas que ingerimos en la dieta. No obstante, estos péptidos necesitan primero ser liberados durante el procesado del alimento o durante la digestión gastrointestinal para poder exhibir o ejercer la actividad biológica (Roberts y Zaloga, 1994). Los péptidos son absorbidos en forma de pequeños péptidos, principalmente en forma de di- y tripéptidos; sin embargo, cantidades pequeñas de péptidos de mayor longitud y proteínas de pequeño tamaño también pueden ser absorbidos (Grimble, 1994). La absorción de péptidos se considera un método más eficiente de ingesta de aminoácidos en comparación con la absorción de una cantidad equivalente de aminoácidos libres (Siemensma et al., 1993). Esto es debido a la existencia de unos sistemas específicos de transporte de péptidos junto con una fase final de digestión de péptidos en aminoácidos libres mediante la acción de peptidasas citoplasmáticas dentro de los enterocitos y su posterior transporte al torrente sanguíneo (Silk et al., 1980; Grimble et al., 1987). De este modo, alimentos específicos pueden ser incorporados a la dieta por su habilidad para liberar péptidos bioactivos. El potencial de muchas proteínas procedentes de alimentos para liberar dichos péptidos bioactivos ha sido ampliamente estudiado (Gómez-Ruiz et al., 2007; Miguel et al., 2007; Ono et al., 2006). Sin embargo, poco se sabe de los péptidos que se pueden liberar de las proteínas de la carne y de productos cárnicos.

La degradación proteolítica de la estructura del músculo constituye una parte importante del proceso de la maduración de la carne, la cual resulta en la generación de diferentes fragmentos proteicos. Se asume que varios grupos de enzimas endógenos del músculo esquelético están involucrados en este proceso. Se incluyen en este grupo las calpaínas, las catepsinas y el proteasoma. Recientemente, algunos autores también han sugerido un papel relevante de las caspasas en esta degradación de las proteínas (Laville et al., 2009; Ouali et al., 2006; Sentandreu et al., 2002). En el caso de los

productos cárnicos crudo-curados, los largos tiempos de procesado de estos productos hace que los fragmentos de proteínas iniciales generados por la acción de estas endopeptidasas sean posteriormente degradados a péptidos más pequeños y aminoácidos libres por la acción de las endopeptidasas del músculo, contribuyendo este hecho a la generación de características típicas de flavor de estos productos. Se asume, por ejemplo, que las dipeptidil peptidasas contribuyen a esta degradación, generando dipéptidos desde el extremo NH-terminal de los polipéptidos resultantes de la acción de las endopeptidasas del músculo (Sentandreu y Toldrá, 2001). Sin embargo, actualmente se dispone de escasa información sobre los péptidos que se generan después de la digestión de la carne de cerdo en nuestro organismo.

En este contexto, el objetivo del presente estudio ha sido identificar y caracterizar los péptidos liberados del músculo *Longissimus dorsi* del cerdo durante la digestión humana simulada *in vitro* mediante la actuación secuencial de la pepsina y pancreatina, analizando el hidrolizado mediante el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem (nanoLC-ESI-MS/MS). La pancreatina es una mezcla de alfa-quimiotripsina, tripsina y otras enzimas pancreáticas. De este modo, la digestión secuencial con pepsina seguida de la digestión con pancreatina ofrece un modelo apropiado para estimar la generación de péptidos en el sistema digestivo humano

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

En el presente trabajo se utilizó músculo esquelético fresco de cerdo (*Longissimus dorsi*) obtenido de "Industrias Cárnicas Vaquero S.A" (Madrid). La enzima pepsina (procedente del estómago de cerdo) se adquirió de Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suiza); la enzima pancreatina (procedente de páncreas de cerdo) se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A). Otros reactivos fueron adquiridos de Sharlau Chemie S.A (Sentmenat, Barcelona).

Digestión *in vitro* de la carne de cerdo

La digestión humana de las proteínas del músculo de cerdo fue simulada *in vitro* utilizando pepsina y pancreatina (ver **Fig. 1**) según el método desarrollado por Laparra et al. (2003). Para este propósito, 4 g de carne de cerdo cruda y troceada (*Longissimus dorsi*) fueron suspendidos en 40 mL de agua bidestilada. Después de simular la masticación humana utilizando un stomacher durante 1 min, el pH se ajustó a 2,0 con HCl 6M. Seguidamente, se añadió pepsina en una proporción de 1:100 enzima:sustrato. Tras 2 h de digestión a 37°C en continua agitación, la enzima se inactivó ajustando el pH a 7,2 con NaHCO₃ 1M. A continuación, se añadió pancreatina en una proporción de 1:50 enzima:sustrato y tras 3 h de digestión a 37°C, la enzima se inactivó por calentamiento a 95°C durante 10 min. El digerido resultante

fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min en frío (4°C) y el sobrenadante fue recogido, constituyendo el hidrolizado de las proteínas del músculo de cerdo.

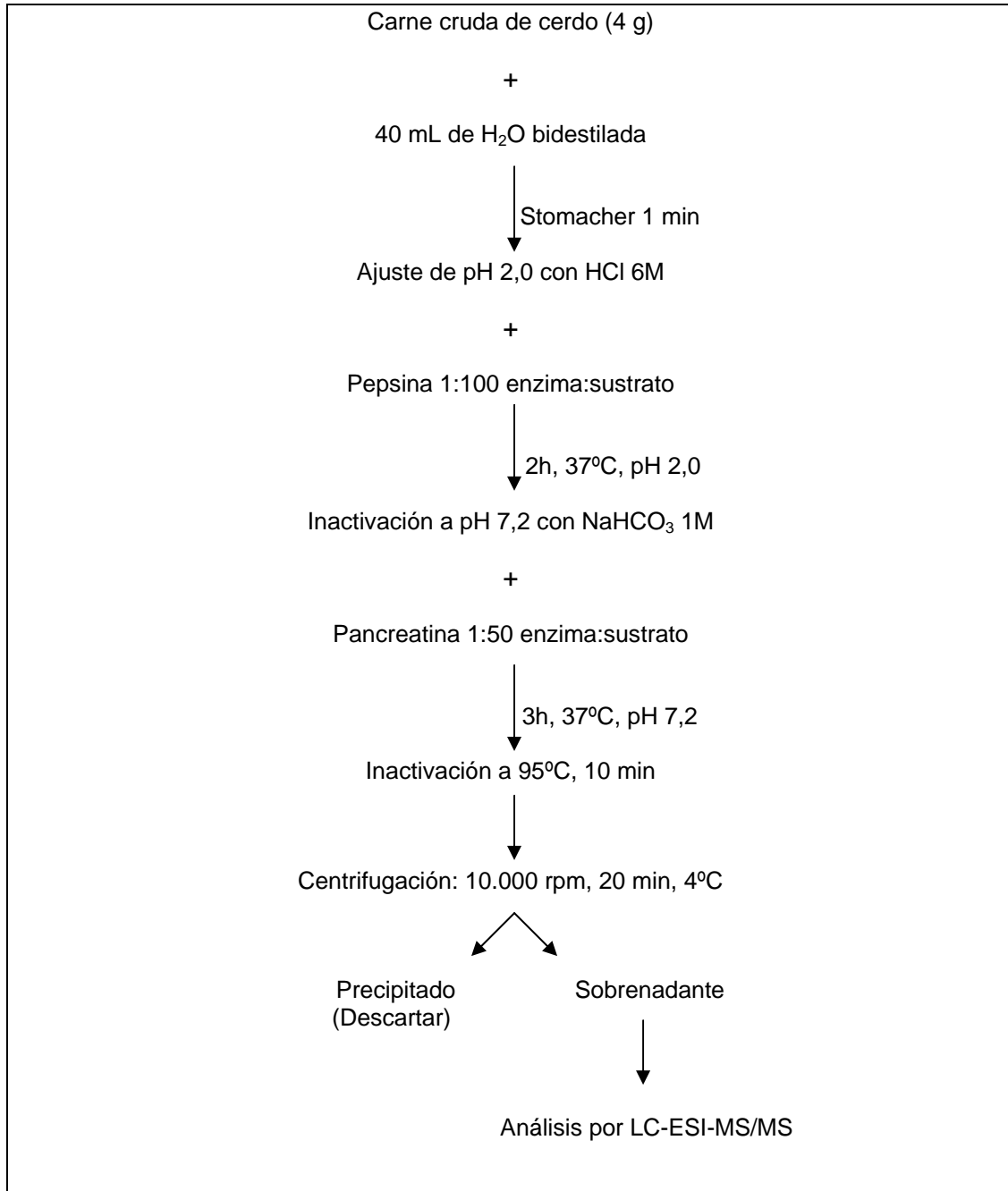


FIGURA 1. Diagrama del proceso de digestión enzimática *in vitro* de la carne de cerdo

Este hidrolizado fue posteriormente desproteínizado mediante la adición de 3 volúmenes de metanol manteniéndose la muestra 20 min a 4°C. A continuación, la muestra fue centrifugada (10.000 rpm durante 20 min a

4°C), recogiendo el sobrenadante y llevándolo a sequedad haciendo uso de un evaporador rotatorio. El hidrolizado desproteínizado y seco fue redisoluto en 1 mL de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua bidestilada, empleándose para la posterior separación e identificación de péptidos.

Separación e identificación de péptidos mediante nanoLC-ESI-MS/MS

Los péptidos contenidos en el hidrolizado desproteínizado fueron separados e identificados mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo-de-vuelo equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray (nanoLC-ESI-MS/MS) utilizando un sistema Ultimate nano-LC (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) acoplado a una fuente de ionización por nanoelectrospray (Protana, Odense, Denmark) y un espectrómetro de masas híbrido QSTAR XL-TOF (MDS Sciex, Applied Biosystems, Concord, Canada).

La muestra (5 µL del hidrolizado desproteínizado diluidos hasta 60 µL con 0,1% de TFA) fue inyectada en el sistema utilizando un inyector FAMOS (LC Packing) a un flujo 40 µL/min con fase A (0,1% de TFA en agua) reteniéndose los péptidos en una precolumna PepMap C18 (5mmx300µM de diámetro interno; LC Packings). Los péptidos fueron a continuación eluidos en una columna analítica PepMap C18 (15cmx75µM de diámetro interno; LC Packings) a un flujo de 300 nL/min y separados en dicha columna utilizando un gradiente lineal de 5% a 50% de fase B (95% Acetonitrilo en 0,1% de TFA, v/v) durante 120 minutos. El equipo QSTAR XL operó en modo de adquisición de 1-s información-dependiente, durante el cual el escáner TOF MS se realizó desde 100 hasta 1000 m/z, seguido de un escáner de ión producto de 3-s desde 100 hasta 1000 m/z de los iones más intensos. El QSTAR XL Q-TOF se calibró con una mezcla de CsI 10⁻⁵ M (132.9054 m/z) y el péptido H-ALILTLVS-OH (829.5398 m/z).

El procesado automático de los espectros, la generación de la lista de picos y la búsqueda en la base de datos se llevó a cabo utilizando el Mascot search v1.6b21 script para el Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en combinación con el motor de búsqueda Mascot (Matrix Science, Inc., London, U.K) y el programa Protein Pilot 2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el algoritmo Paragon. La identificación del origen proteico de los péptidos se llevó a cabo utilizando la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las asignaciones generadas de forma automática de los espectros de MS/MS con las secuencias de péptidos en la base de datos fueron posteriormente verificadas manualmente.

Los análisis del hidrolizado de carne desproteínizado mediante nanoLC-ESI-MS/MS fueron realizados por triplicado con la finalidad de validar los resultados y confirmar las secuencias de los péptidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proteínas son fragmentadas durante la digestión en péptidos de diferente tamaño y aminoácidos libres como resultado de la ruptura de los enlaces de los péptidos por la acción de las enzimas digestivas. Las secuencias de los péptidos generados tras la digestión *in vitro* de las proteínas del músculo fueron estudiadas en este trabajo mediante el uso de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo-de-vuelo equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray (nano LC-ESI-MS/MS). El perfil de separación de péptidos obtenido se muestra en la **Figura 2**.

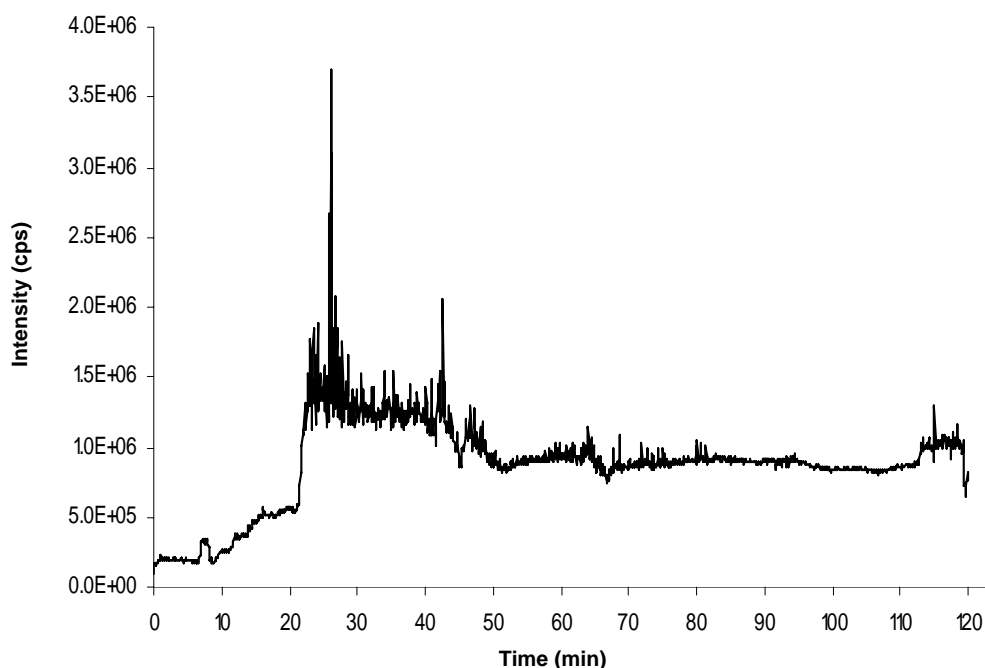


FIGURA 2. Cromatograma correspondiente a la separación del hidrolizado de carne de cerdo obtenido tras la digestión *in vitro* de la carne utilizando un nanoLC acoplado a un espectrómetro de masas QSTAR XL Q-TOF

Un estudio detallado de la información proporcionada por este análisis permitió la identificación de péptidos originados de proteínas del músculo esquelético tanto sarcoplásmicas, como miofibrilares o del colágeno. Como se puede apreciar en las **Tablas 1, 2 y 3**, los péptidos secuenciados se identificaron de iones conteniendo 1, 2, 3 y 4 cargas positivas. De esta manera, se obtuvo la secuencia de 12 péptidos monocargados. 35 Péptidos se identificaron a partir de iones doblemente cargados. 3 Péptidos se identificaron de iones triplemente cargados y la secuencia de 1 péptido se obtuvo de 1 ión cargado con 4 cargas positivas. Las secuencias de péptidos conteniendo una alta proporción de aminoácidos de naturaleza básica (histidina, lisina, arginina) se obtuvieron de iones conteniendo dos o más cargas positivas, como era de esperar.

TABLA 1. Péptidos originados de proteínas miofibrilares identificados en el hidrolizado de carne de cerdo tras la digestión secuencial *in vitro* de la carne con pepsina y pancreatina.

proteína origen (NCBI accesion no.)	posición ^a	secuencia	masa obs ^b	carga	masa calc ^c	tiempo de retención		
						(min)	Paragon ^d	Mascot ^d
alfa-actina (NP001161267)	156-162	DSGDGVT	650.28	(1+)	649.27	16.28	X	
	300-306	VMSGGTT	652.31	(1+)	651.31	18.98	X	
	23-30	FAGDDAPR	424.7	(2+)	847.4	25.47	X	
	107-115	LTEAPLNPK	491.77	(2+)	981.53	25.52	X	X
	179-186	RLDLAGR	458.27	(2+)	914.52	26.91	X	
	269-276	IGMESAGI	777.39	(1+)	776.39	40.17	X	
	242-248	YELPDGQ	821.36	(1+)	820.35	44.90	X	
beta-actina (AAS55927)	51-57	AGDDAPR	351.17	(2+)	700.31	14.91		X
	95-102	TLKYPIEH	432.25	(2+)	862.48	28.54	X	X
	358-364	IIAPPER	398.24	(2+)	794.47	49.62	X	X
cadena ligera de miosina 1 (ABK55642)	26-33	PAPAPPKE	403.72	(2+)	805.43	22.74		X
cadena ligera de miosina 2 (AAX07945)	68-76	AFPPDVGGN	437.23	(2+)	872.45	55.13	X	
	67-76	AAFPPDVGGN	472.31	(2+)	942.61	55.51	X	
cadena pesada de miosina 1 (NP001098421)	147-155	KRQEAPPHI	359.21	(3+)	1074.62	24.34	X	
	148-155	RQEAPPHI	474.25	(2+)	946.5	25.05	X	X
	124-129	VTVNPY	692.35	(1+)	691.34	29	X	X
	592-597	NITGWL	703.38	(1+)	702.38	65	X	
tropoina T (BAD15382)	54-62	PKIPEGEKV	499.28	(2+)	996.55	25.32	X	

^a Posición del péptido dentro de la proteína origen y que ha sido identificado en la especie porcina

^b Masa molecular del ión observado en el sistema nanoLC-ESI-MS/MS calculada en Daltons (Da)

^c Masa relativa calculada (Da) del péptido identificado

^d Los resultados presentan alta homología en la asignación de los péptidos ($p < 0.05$). Los péptidos marcados con una "X" fueron observados utilizando el algoritmo Paragon y/o el motor de búsqueda Mascot

Las **Tablas 1, 2 y 3** también indican la posición exacta de los péptidos identificados en su proteína de origen, su masa observada y calculada, así como sus modificaciones en la secuencia, en el caso de que existan.

La búsqueda de similitud de las secuencias con el programa Blast revelan un 100% de homología de las secuencias identificadas con proteínas del músculo esquelético del cerdo, con la excepción de un péptido que mostró homología de secuencia con la proteína del colágeno alfa 2, tipo I, procedente de la especie *Bos taurus* (**Tabla 3**). Ya que no todas las proteínas del cerdo han sido completamente secuenciadas e introducidas en las bases de datos a día de hoy (como por ejemplo algunos tipos de colágeno del cerdo), se puede pensar que dicho péptido se debe de haber originado de la proteína de cerdo.

TABLA 2. Péptidos originados de proteínas sarcoplásmicas identificados en el hidrolizado de carne de cerdo tras la digestión secuencial *in vitro* de la carne con pepsina y pancreatina.

proteína origen						tiempo de retención		
(NCBI accesion no.)	posición ^a	Secuencia	masa obs ^b	carga	masa calc ^c	(min)	Paragon ^d	Mascot ^d
creatín quinasa muscular (NP001123421)	60-68	GVDNPGHPF	470.24	(2+)	938.47	28.4	X	
	57-67	IQTGVDNPGHP	567.79	(2+)	1133.57	28.44	X	
	59-68	TGVDNPGHPF	520.76	(2+)	1039.52	30.09	X	
	15-23	KAEEEYPDL	547.27	(2+)	1092.53	44.65	X	
beta-enolasa (NP001037992)	261-268	FKSPDDPS	446.71	(2+)	891.41	25.82	X	
	284-291	IKNYPVVS	460.28	(2+)	918.56	28.09	X	
	204-216	ATNVGDEGGFAPN	624.79	(2+)	1247.57	38.27	X	
	292-300	IEDPFDQDD	547.26	(2+)	1092.5	64.71	X	
	291-300	SIEDPFDQDD	591.31	(2+)	1180.61	70.48	X	
fosfoglicerato mutasa 2 (NP001128440)	143-150	AGLKPGEL	392.74	(2+)	783.47	38.4	X	
	118-127	SFDIPPPMD	558.27	(2+)	1114.53	81.24	X	
fosfoglicerato quinasa 1 (NP001093402)	65-75	GRPDGIMPDK	591.81	(2+)	1181.61	27.28	X	
	61-75	MSHLGRPDGIMPDK	413.29	(4+)	1649.13	32.47	X	
piruvato quinasa 3 isoforma 3 (XP001929125)	513-520	TGWRPGSG	409.21	(2+)	816.42	29.45	X	
	208-215	GVNLPGAA ^f	699.39	(1+)	698.39	39.36	X	
	34-41	DIDSPIT	857.44	(1+)	856.43	40.09	X	
fructosa-bisfosfato aldolasa A AAR14175	71-81	PEILPDGDHDL	610.8	(2+)	1219.59	62.16	X	X
GA3PDH ^e (ABI29187)	10-18	IKWGDAGAT	459.75	(2+)	917.50	30.02	X	X
	158-165	FRVPTPNV	465.28	(2+)	928.56	40.19	X	X
	44-50	VIISAPS	686.41	(1+)	685.41	41.17	X	X
ATPasa retículo sarcoplas./endoplasm calcio (O77696)	36-42	GFNPPDL	759.39	(1+)	758.38	50.15	X	
	35-42	LGFNPPDL	873.48	(1+)	872.48	65.09	X	
bomba del retículo sarcoplas./endoplasm calcio (NP999030)	188-198	IKHTDPVPDPR ^g	430.26	(3+)	1287.76	24.28	X	
glucosa fosfato isomerasa (NP999495)	155-165	IGIGGSDLGPL	998.58	(1+)	997.57	62.18	X	

^a Posición del péptido dentro de la proteína origen y que ha sido identificado en la especie porcina

^b Masa molecular del ión observado en el sistema nanoLC-ESI-MS/MS calculada en Daltons (Da)

^c Masa relativa calculada (Da) del péptido identificado

^d Los resultados presentan alta homología en la asignación de los péptidos (p<0.05). Los péptidos marcados con una "X" fueron observados utilizando el algoritmo Paragon y/o el motor de búsqueda Mascot

^e Glicer aldehído 3-fosfato-deshidrogenasa

^f Una deamidación en la asparagina

^g Una metilación del ácido aspártico

TABLA 3. Péptidos originados de proteínas de colágeno identificados en el hidrolizado de carne de cerdo tras la digestión secuencial *in vitro* de la carne con pepsina y pancreatina.

proteína origen (NCBI accesion no.)	posición ^a	secuencia	masa obs ^b	carga	masa calc ^c	tiempo de retención (min)	Paragon ^d	Mascot ^d
alfa 1, tipo II, colágeno (XP001925994)	207-217	GPRGPPGPAGA ^{f,g}	483.25	(2+)	964.5	23.79	X	
alfa 1, tipo V, colágeno (NP001014971)	597-608	GVQGPAGK ^f	553.3	(2+)	1104.59	27.24	X	
alfa 1, tipo VII, colágeno (XP001924460)	1420-1432	GLPGLPGSPGQG ^f	575.29	(2+)	1148.57	31.49	X	
alfa 1, tipo XI, colágeno (XP001929407)	1154-1166	LQGPVGIAGG ^f	547.28	(2+)	1092.54	24.61	X	
	743-752	EKGSLGPPGQ ^f	549.78	(2+)	1097.55	25.17	X	
alfa 2, tipo I, colágeno (BAE93247)	91-103	GPPGAVGAPGQ ^f	547.28	(2+)	1092.54	24.83	X	
	89-100	PRGPPGAVGAPG ^f	532.78	(2+)	1063.55	31.92	X	
alfa 2, tipo I, colágeno ^c (NP776945)	692-706	GEAGPAGPAGPR ^f	631.32	(2+)	1260.61	27.83	X	X
alfa 6, tipo IV, colágeno (XP001925433)	560-575	PPGIGLPGSPGPRGL ^f	500.92	(3+)	1499.76	28.25	X	

^a Posición del péptido dentro de la proteína origen y que ha sido identificado en la especie porcina

^b Masa molecular del ión observado en el sistema nanoLC-ESI-MS/MS calculada en Daltons (Da)

^c Masa relativa calculada (Da) del péptido identificado

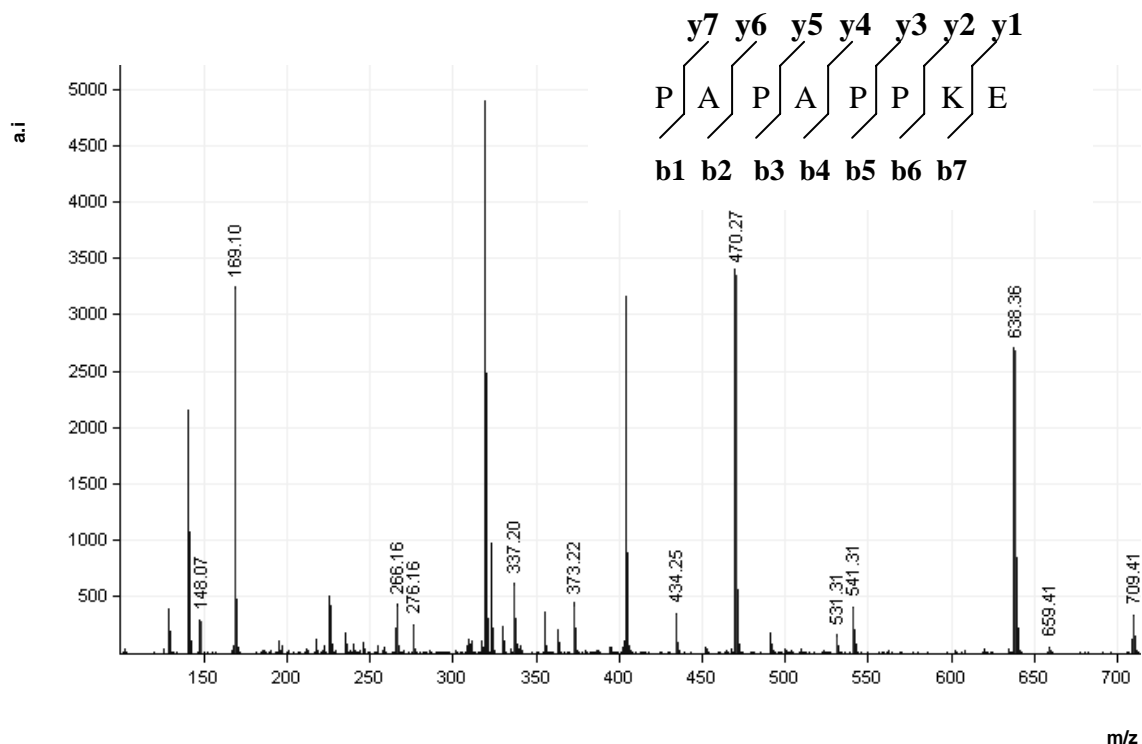
^d Los resultados presentan alta homología en la asignación de los péptidos ($p < 0.05$). Los péptidos marcados con una "X" fueron observados utilizando el algoritmo Paragon y/o el motor de búsqueda Mascot

^e Proteína origen *Bos taurus*

^f Una oxidación en la prolina

^g Una oxidación en la arginina

Como se ha comentado, todos los espectros de fragmentación de los péptidos (MS/MS) han sido interpretados utilizando el programa online Mascot, el algoritmo Paragon y también de manera manual. La **Figura 3** muestra el espectro de MS/MS correspondiente al péptido PAPAPPKE como un ejemplo de los espectros obtenidos.



Ión 403.72 ²⁺				
	b	Secuencia	y	
1	98.06	P		8
2	169.10	A	709.41	7
3	266.16	P	638.36	6
4	337.20	A	541.31	5
5	434.25	P	470.27	4
6	531.31	P	373.22	3
7	659.41	K	276.16	2
8		E	148.07	1

FIGURA 3. Espectro MS/MS del ión 403.72²⁺ obtenido del análisis del hidrolizado de cerdo mediante nanoLC-ESI-MS/MS. Se muestran los iones *y* y *b* asignados por MASCOT (resaltados en negra).

En el presente estudio, hemos identificado y caracterizado péptidos que provienen de la digestión *in vitro* de carne de cerdo cruda. Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio no mostraron diferencias en términos de estructura primaria entre las proteínas de carne de cerdo cruda y cocinada. La única diferencia remarcable entre carne cruda y cocinada estuvo relacionada con la desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas de la carne cocinada, pero este hecho no tiene un efecto relevante en la hidrólisis de la secuencia primaria de las proteínas (resultados no mostrados). Por lo tanto, consideramos que nuestro experimento con carne cruda de cerdo puede proporcionar, en una primera aproximación, un buen modelo para la estimación de péptidos generados tras simular la digestión humana. De esta forma, hemos identificado péptidos de una longitud que está en concordancia con el tamaño de péptidos que pueden atravesar más fácilmente la luz intestinal (Roberts et al., 1999) y que pueden ejercer una función nutricional o bioactiva (Gill et al., 1996). Así, hemos encontrado fragmentos de péptidos que abarcan desde seis a dieciséis residuos de aminoácidos (ver **Tablas 1, 2 y 3**). Este tamaño concuerda con la longitud de

péptidos previamente identificados en otros estudios después de la digestión de diferentes proteínas animales (Bauchart et al., 2006; Bauchart et al., 2007; Chabance et al., 1998).

Se ha observado una intensiva proteólisis de las proteínas del músculo de cerdo tras la digestión *in vitro* con pepsina y pancreatina, lo que demuestra la efectiva acción de las enzimas digestivas. Este hecho puede ser observado en la complejidad del perfil cromatográfico del hidrolizado de la carne de cerdo (**Figura 2**). A pesar de que un importante número de péptidos han sido identificados en este hidrolizado, es de suponer que muchos otros péptidos pueden haber sido generados durante la digestión *in vitro*, pero hay que asumir que, teniendo en cuenta el tamaño de los péptidos estudiados en relación con el tamaño de péptidos de estudios previos (Chabance et al., 1998; Hasan et al., 2006), que los péptidos identificados en este trabajo corresponden a aquellos que están presentes en el hidrolizado en mayor cantidad. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que todos los péptidos identificados fueron fragmentos de las proteínas más abundantes del músculo, como son por ejemplo la actina, miosina o creatin kinasa.

Las enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos entre aminoácidos, produciendo una mezcla de péptidos de diferente tamaño molecular y aminoácidos libres. La habilidad de las peptidasas para hidrolizar las proteínas es altamente variable, por lo que la selección de las enzimas apropiadas para producir los hidrolizados (teniendo bien definidas las características fisicoquímicas y nutricionales a estudiar) es algo esencial (Clemente, 2002). En nuestro estudio se han seleccionado, como ya se ha comentado anteriormente, las enzimas digestivas pepsina y pancreatina, siendo esta última una mezcla de enzimas pancreáticas. La pepsina es una endopeptidasa que actúa a nivel del estómago y que hidroliza los enlaces de los péptidos dentro de la proteína de manera aleatoria para producir péptidos de longitud relativamente larga. La digestión con pepsina afecta pues a la estructura de las proteínas, abriendo las cadenas de las mismas y ofreciendo un lugar más accesible para la posterior acción hidrolítica de la pancreatina. Se sabe que la hidrólisis con pepsina suele generar péptidos que contienen Y, F o L en la posición N-terminal (Savoie et al., 2005). Este es el caso de diferentes péptidos identificados que contienen estos aminoácidos en dicha posición, como por ejemplo el péptido LTEAPLNPK procedente de la alfa-actina (**Tabla 1**) o el péptido FKSPDDPS originado de la beta-enolasa (**Tabla 2**).

Además, los aminoácidos M, F o L son también frecuentemente encontrados también en la posición C-terminal de los péptidos generados después de la digestión *in vitro* con pepsina (Kageyama, 2002). En cuanto a este último aspecto, se han identificado en este trabajo algunos péptidos con estos aminoácidos en la posición C-terminal, como por ejemplo el péptido TGVDNPGHPF, originado a partir de la creatina quinasa (**Tabla 2**).

Tras la hidrólisis con pepsina, el siguiente paso en la digestión gastrointestinal es la hidrólisis de los polipéptidos generados por parte de las peptidasas pancreáticas. Este paso se realizó utilizando la pancreatina, la cual es la mezcla de las diferentes peptidasas tales como la tripsina, la alfa-quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasas A y B. Todas estas enzimas,

con la excepción de las carboxipeptidasas, son endopeptidasas. Las carboxipeptidasas son exopeptidasas que sistemáticamente liberan aminoácidos de la posición C-terminal de los péptidos. En este trabajo hemos observado la generación de péptidos que poseen leucina en posición C-terminal, un hecho que es característico de la hidrólisis con quimiotripsina (Folk y Schirmer, 1965). Este sería el caso del péptido PEILPDGDHDL, generado a partir de la fructosa-bifosfato aldolasa A (**Tabla 2**).

Por otro lado, los péptidos que poseen en la posición C-terminal arginina o lisina serían característicos de la acción de la tripsina (Gray y Cooper, 1971), como ocurre por ejemplo en el caso del péptido IIAPPER, originado a partir de la beta-actina (**Tabla 1**).

Se ha observado que el uso inicial de endopeptidasas facilita la acción posterior de las exopeptidasas, de manera que se alcanza una más completa degradación de la proteína. Otro hecho a destacar es el número de péptidos identificados originados a partir del colágeno con una alta proporción de glicina, como es el caso del péptido GPRGPPGAGA (**Tabla 3**). El colágeno es la proteína más importante del tejido conectivo conteniendo altas cantidades de glicina y prolina. Como se puede observar en la **Tabla 3**, todos los péptidos identificados procedentes del colágeno contenían una prolina oxidada. Además, el péptido GPRGPPGAGA tenía adicionalmente una arginina oxidada. En la **Tabla 2** podemos también observar péptidos con modificaciones adicionales. Así pues, el péptido GVNLPGAA, originado de la isoforma 3 de la piruvato kinasa, contiene una deamidación de la asparagina mientras que el péptido IKHTDPVPDPR, originado de la ATPasa del retículo de calcio sarcoplásmico/endoplásmico, contiene una metilación del ácido aspártico.

Es importante resaltar el hecho de que todos los péptidos identificados en este trabajo, con la excepción de unos pocos, tienen una gran proporción de prolina en sus secuencias, lo que sugiere una mayor resistencia a una hidrólisis posterior. De hecho, en los péptidos que contienen prolina se ha observado que generalmente son más resistentes a la acción de enzimas digestivas (Hausch et al., 2002; Kaspari et al., 1996). Además, la proporción de prolina en las secuencias de los péptidos identificados está en concordancia con la abundancia media de este aminoácido en las proteínas de la carne (Sosulski, 1990).

También es importante resaltar que existe cierta similitud entre los péptidos identificados en este estudio y aquellos identificados en estudios previos. Algunos de los péptidos generados después de la digestión *in vitro* de la carne de cerdo y provenientes de la alfa-actina (**Tabla 1**) comparten una homología de secuencia parcial con algunas secuencias de péptidos previamente identificados en un estudio sobre péptidos generados durante la digestión *in vivo* en cerdos de proteínas provenientes de carne de ternera y carne de trucha (Bauchart et al., 2007). A modo de ejemplo, se podría citar el péptido AGDDAPR (**Tabla 1**), identificado en este estudio y que comparte homología parcial en la secuencia con el péptido AGDDAPRAVF obtenido después de la digestión *in vivo* de la actina de la carne de ternera, así como el péptido IGMESAGI (**Tabla 1**) que comparte una homología parcial con el

péptido IGMESAGIHE, obtenido tras la digestión *in vivo* de la actina procedente de trucha (Bauchart et al., 2007).

Las pequeñas diferencias de secuencia encontradas entre los péptidos identificados en nuestro estudio y aquellos identificados en estudios previos pueden ser debidas a las diferencias entre los modelos de digestión, el tipo de carne utilizada, la preparación de la muestra y/o las diferentes técnicas empleadas para la identificación de los péptidos. A pesar de dichas diferencias, el gran parecido en la generación de péptidos sería indicativo de una similar eficiencia del proceso digestivo (Bauchart et al., 2007).

En trabajos anteriores se ha estudiado la generación de péptidos tras la hidrólisis de la carne de cerdo con diferentes peptidasas y su efecto como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I (ACE) lo que potencialmente daría lugar a una acitividad antihipertensiva (Arihara et al., 2001; Katayama et al., 2003). Se sabe que la ACE se une preferiblemente a péptidos que contienen prolina en la posición C-terminal (Cheung et al., 1980) quedando inhibida la actividad de la enzima. En este trabajo se han identificado algunos péptidos terminados en prolina, como el péptido GVQGPPGPAGKP, derivado de colágeno alfa1, tipo V. También se ha observado que aminoácidos como la arginina o la lisina, situados en posición C-terminal, pueden contribuir a la acción inhibitoria de la ACE (Ondetti y Cushman, 1977). En los péptidos identificados FAGDDAPR (**Tabla 1**) o GRPDGIPMPDK (**Tabla 2**), estos aminoácidos aparecen situados en posición C-terminal. Los resultados de este trabajo sugerirían pues, que la digestión fisiológica de las proteínas de cerdo podrían generar péptidos con actividad biológica. No obstante, es necesario un estudio posterior de los péptidos identificados para determinar si éstos pueden exhibir alguna actividad inhibitoria de la ACE de una manera eficaz.

El presente estudio muestra que la carne de cerdo puede constituir una fuente de proteína animal de alta calidad y además servir como una fuente importante de péptidos con actividad biológica. El hidrolizado de proteína obtenido mediante el uso secuencial de pepsina y pancreatina podría ser utilizado para analizar y categorizar las proteínas y sus péptidos derivados de la hidrólisis con potencial actividad biológica.

CONCLUSIONES

El presente trabajo pone de manifiesto la utilidad de la simulación *in vitro* de la digestión y la tecnología proteómica como un medio efectivo para identificar y caracterizar los péptidos que pueden ser generados tras la digestión de las proteínas de la carne de cerdo. Hasta la fecha, se dispone de poca información sobre las secuencias de péptidos generados tras la digestión de las proteínas de la carne. Las secuencias identificadas en este trabajo muestran que entre los productos principales de la digestión de las proteínas del músculo de cerdo se encuentran péptidos que abarcan una longitud de entre seis y dieciseis aminoácidos. Los péptidos identificados en este estudio son indicativos de cómo las proteínas pueden romperse en pequeños fragmentos para poder ser más fácilmente absorbidos y por tanto

ejercer mejor su función nutricional o, en su caso, ejercer su actividad biológica, aunque para corroborar este último aspecto se requiere un estudio en mayor profundidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación Vaquero para la I+D en carne de cerdo (Madrid) la beca otorgada a E.E. También damos las gracias al Centro de Investigación Príncipe Felipe (miembro de Proteored), de Valencia, y muy especialmente a Luz Valero, por su valiosa contribución en el análisis de espectrometría de masas.

REFERENCIAS

- 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* (3), 319-324.
- Bauchart, C.; Remond, D.; Chambon, C.; Mirand, P. P.; Savary-Auzeloux, I.; Reynes, C.; Morzel, M. Small peptides (< 5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci.* **2006**, *74* (4), 658-666.
- Bauchart, C.; Chambon, C.; Mirand, P. P.; Savary-Auzeloux, I.; Remond, D.; Morzel, M. Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chem.* **2007**, *100* (4), 1566-1572.
- Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J. C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jolles, P.; Fiat, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* **1998**, *80* (2), 155-165.
- 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 - Importance of the CooH-Terminal Dipeptide Sequence. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255* (2), 401-407.
- Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *11*, 254-262.
- Dangin, M.; Boirie, Y.; Guillet, C.; Beaufere, B. Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *J. Nutr.* **2002**, *132* (10), 3228S-3233S.
- Folk, J. E.; Schirmer, E. W. Chymotrypsin C .I. Isolation of Zymogen and Active Enzyme - Preliminary Structure and Specificity Studies. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240* (1), 181-192.
- Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric. Food Chem.* **1996** *44*, 6-29.
- Gill, I.; LopezFandino, R.; Jorba, X.; Vulfson, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme Microb. Tech.* **1996**, *18* (3), 162-183.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos M., Recio, I. Identification of novel antiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 4202-4211.

- Gray, G. M.; Cooper, H. L. Protein Digestion and Absorption. *Gastroenterology* **1971**, *61* (4), 535-544.
- Grimble, G. K. The Significance of Peptides in Clinical Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **1994**, *14*, 419-447.
- Grimble, G.K., Rees, R.G., Keohane, P.P., Cartwright, T., Desreumaux, M., Silk, D.B. Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. *Gastroenterology*, **1987**, *92*, 136-142.
- Hasan, F.; Kitagawa, M.; Kumada, Y.; Hashimoto, N.; Shiiba, M.; Katoh, S.; Terashima, M. Production Kinetics of ACE inhibitory peptides from bonito meat in artificial gastric juices. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 505-511
- Hausch, F.; Shan, L.; Santiago, N. A.; Gray, G. M.; Khosla, C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol-Gastr L.* **2002**, *283* (4), G996-G1003.
- Hoffmann, K. Nutritional value of proteins and protein requirements of people with special reference to meat proteins. *Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch*, **1993**, *32*, 422-429.
- Kageyama, T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (2), 288-306.
- Kaspari, A.; Diefenthal, T.; Grosche, G.; Schierhorn, A.; Demuth, H. U. Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *BBA-Protein Struct M.* **1996**, *1293* (1), 147-153.
- 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.
- Kitts, D. D.; Weiler, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Design* **2003**, *9* (16), 1309-1323.
- Korhonen, H.; Pihlanto, A. Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Design* **2003**, *9* (16), 1297-1308.
- Laparra J.M., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an *in vitro* digestion method. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, (20), 6080-6085.
- Laville, E.; Sayd, T.; Morzel, M.; Blinet, S.; Chambon, C.; Lepetit, J.; Renand, G.; Hocquette, J. F. Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (22), 10755-10764.
- Miguel, M.; Alonso, M.J.; Salaices, M.; Aleixandre, A.; Lopez-Fandiño, R. Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. *Food Chem.* **2007**, *104* (1), 163-168.
- Ondetti, M. A.; Cushman, D. W. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme - New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science* **1977**, *196* (4288), 441-444.

- Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., & Takahashi, K. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2006** 41, (4), 383-386.
- Ouali, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Coulis, G.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Aubry, L.; Sentandreu, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* **2006**, 74 (1), 44-58.
- Roberts, P.R., Zaloga G.P. Dietary bioactive peptides. *New horizons (Baltimore, Md.)*, **1994**, 2, (2), 237-243.
- Roberts, P. R.; Burney, J. D.; Black, K. W.; Zaloga, G. P. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* **1999**, 60 (4), 332-337.
- Savoie, L.; Gauthier, S. F.; Marin, J.; Pouliot, Y. In vitro determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins. *J. AOAC Int.* **2005**, 88 (3), 935-948.
- Sentandreu, M. A.; Toldra, F. Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 213 (2), 83-87.
- Sentandreu, M.A, Coulis, G., Ouali, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Tech.* **2002** 13, (12), 398-419.
- Siemensma, A. D.; Weijer, W. J.; Bak, H. J. The Importance of Peptide Lengths in Hypoallergenic Infant Formulas. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, 4 (1), 16-21.
- Silk, D.B., Fairclough, P.D., Clark, M.L., Hegarty, J.E., Marrs, T.C., Addison, J.M., Burston, D., Clegg, K.M., Matthews, D.M. Use of a peptide rather than a free amino acid nitrogen source in chemically defined elemental diet. *JPEN-Parenter Enter.* **1980**, 4, (6), 548-553.
- Sosulski, F. W.; Imafidon, G. I. Amino-Acid-Composition and Nitrogen-To-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38 (6), 1351-1356.