



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Hidrólisis De Proteínas Sarcoplásmicas Y Generación De Péptidos Bioactivos Durante La Elaboración De Jamón Curado

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS

ALUMNO/A: Jaime Ballester Sánchez

TUTOR/A ACADEMICO: Fidel Toldrá Vilardell

COTUTOR/A: M^a Concepción Aristoy Albert

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Leticia Mora Soler

Curso Académico: 2015/16

VALENCIA, 1 de Julio de 2016

RESUMEN

Durante el proceso de elaboración del jamón curado tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas entre las que destaca la intensa hidrólisis de las proteínas musculares. Esta proteólisis genera péptidos que pueden tener un impacto positivo en la calidad final del jamón, ya que influye en sus características organolépticas y de textura. Además, recientemente se ha descrito el potencial bioactivo de algunos de los péptidos generados, tales como actividad antihipertensiva, antioxidante o antimicrobiana. Así, se propone un método para el fraccionamiento y estudio de péptidos con actividad antioxidante e inhibidores de la ECA, generados de forma natural por acción de las enzimas endógenas musculares de las proteínas sarcoplásmicas en el jamón a distintos tiempos de curado. En el presente trabajo, se han identificado las principales fracciones bioactivas del jamón mediante una columna Sephacryl S-100, consiguiendo la separación de estas fracciones en un tiempo de 6 horas. La mayor bioactividad se ha registrado en dos fracciones principalmente, concluyendo que el jamón es una buena fuente de compuestos bioactivos a distintos tiempos de proceso, especialmente en la etapa final de curado.

Palabras clave: proteólisis, jamón curado, proteínas sarcoplásmicas, péptidos, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva.

RESUM

Al llarg del procés d'elaboració del pernil curat tenen lloc una sèrie de reaccions bioquímiques entre les que destaca la intensa hidròlisi de les proteïnes musculars. Aquesta proteòlisi genera pèptids que poden tindre un impacte positiu en la qualitat final del pernil, ja que influïx en les seues característiques organolèptiques i de textura. A més, recentment s'ha descrit el potencial bioactiu d'alguns dels pèptids generats, com ara activitat antihipertensiva, antioxidant o antimicrobiana. Així, es proposa un mètode per al fraccionament i estudi de pèptids amb activitat antioxidant e inhibidors de l'ECA, generats de forma natural per acció dels enzims endògens musculars de les proteïnes sarcoplàsmiques al pernil a distints temps de curat. En aquest treball, s'han identificat les principals fraccions bioactives del pernil per mitjà d'una columna Sephacryl S-100, aconseguint la separació d'estes fraccions en un temps de 6 hores. La major bioactivitat s'ha registrat en dos fraccions principalment, concloent que el pernil és una bona font de compostos bioactius al llarg del seu procesat, especialment a la fi del curat.

Paraules clau: proteòlisi, pernil curat, proteïnes sarcoplàsmiques, pèptids, activitat antioxidant, activitat antihipertensiva.

ABSTRACT

During the dry-curing process of ham different biochemical reactions take place among which the intensive hydrolysis of muscle proteins is one of the most important. Proteolysis generates peptides that can exert a positive impact on the final quality of the ham, because it influences their organoleptic and textural characteristics. Recently, it has been described the bioactive potential of some of the generated peptides such as antihypertensive, antioxidant, and antimicrobial activity. Thus, a method for fractionating and study antioxidant and ACE inhibitory peptides naturally generated by endogenous ham enzymes in sarcoplasmic proteins at different curing times is proposed. In this study, the identification of the main bioactive fractions of dry-cured ham has been done using a Sephacryl S-100 column in a time of 6 hours. The highest bioactivity is mainly registered in two fractions, concluding that dry-cured ham is a good source of bioactive compounds during its processing, especially at the end of the curing period.

Keywords: proteolysis, dry-cured ham, sarcoplasmic proteins, peptides, antioxidant activity, antihypertensive activity.

INTRODUCCIÓN

El jamón curado es un alimento que forma parte de la dieta habitual en España donde prácticamente el 90% de la población lo consume, además, representa una fuente de proteínas de alto valor biológico y aporta vitaminas del grupo B, minerales y elementos traza biodisponibles (Jiménez-Colmenero et al., 2010).

A lo largo del proceso de elaboración del jamón se producen una serie de reacciones enzimáticas entre las que destaca la proteólisis, que será la responsable de que las proteínas musculares se degraden progresivamente y den lugar a una gran cantidad de péptidos y aminoácidos libres que van a contribuir al sabor, aroma, textura y calidad final del jamón curado (Aristoy y Toldrá, 1995; Toldrá y Flores, 1998; Lametsch et al., 2003).

Las principales enzimas musculares responsables de los cambios proteicos que ocurren durante el proceso de curado del jamón (**ver Figura 1**) son las endopeptidasas; catpsinas y calpaínas, que hidrolizan las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares generando grandes polipéptidos, y las exopeptidasas; aminopeptidasas, carboxipeptidasas, peptidilpeptidasas y peptidasas, que degradan los polipéptidos en pequeños péptidos y aminoácidos libres (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá et al., 2000).

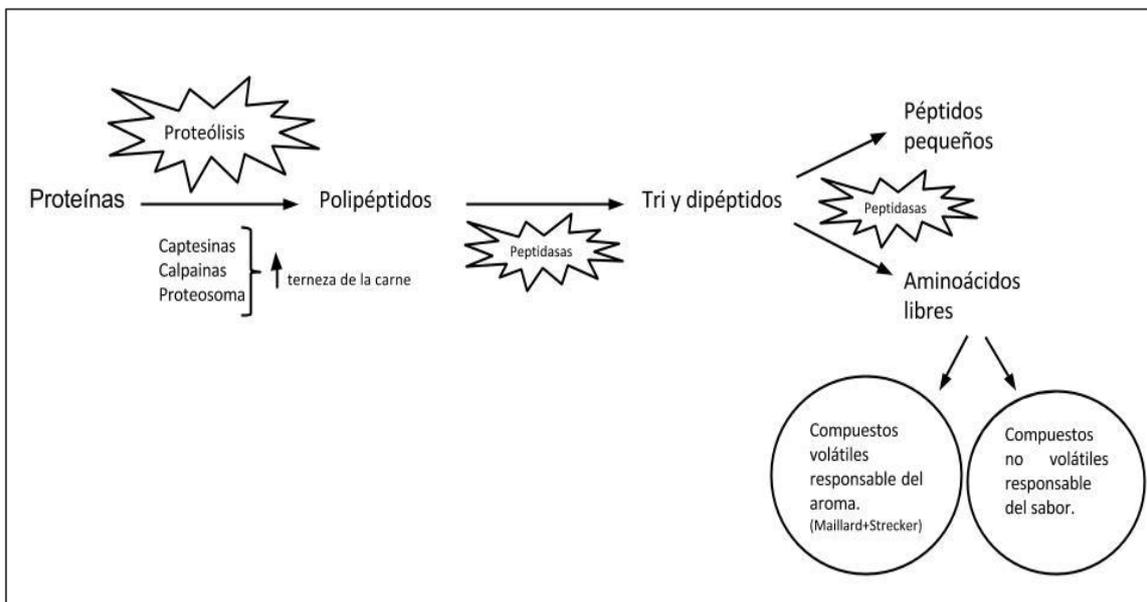


Figura 1. Proceso de hidrólisis de las proteínas. Adaptación (Armenteros et al. 2010)

La degradación de proteínas, así como la generación de péptidos y aminoácidos libres durante el proceso de curado del jamón han sido estudiadas en diversos trabajos, en los cuales se han utilizado la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar los fragmentos proteicos previamente a su identificación (Rodríguez-Núñez et al., 1995; Hansen-Møller et al., 1997; Sentrandreu et al., 2003). Sin embargo, la identificación de los péptidos generados de forma natural durante la proteólisis sólo ha sido posible a través del uso de técnicas proteómicas de última generación como la espectrometría de masas en tándem. De hecho, recientes estudios proteómicos han identificado péptidos derivados de proteínas miofibrilares tales como actina, cadena ligera de miosina, titina o troponina T (Luccia et al., 2005; Sentrandreu

et al., 2007; Mora et al., 2009a; Mora et al., 2010), y de proteínas sarcoplásmicas como creatina quinasa, mioglobina o enzimas glicolíticas (Mora et al., 2009b; Mora et al., 2011; Mora y Toldrá, 2012).

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 poseer propiedades funcionales y/o bioactivas. Así, el estudio de estos péptidos, permitirá conocer mejor las propiedades nutricionales de los alimentos y en su caso utilizarlos como ingredientes funcionales (Vercruyssen 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). 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). Sus actividades dependen de su composición en aminoácidos y secuencia (Korhonen & Pihlanto, 2003). El jamón curado ofrece una fuente potencial de péptidos bioactivos.

Existen algunos estudios sobre la generación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la carne de productos cárnicos fermentados (salchichón y jamón curado), donde, se han estudiado actividades antioxidantes e inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). 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 (Arihara y Ohata, 2008; Broncano, et al., 2011). Se ha reportado la presencia de numerosos péptidos con actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, algunos de ellos con una relevante actividad antihipertensiva *in vivo*, en el jamón curado (Escudero et al., 2013). De hecho, el péptido AAATP mostró un valor de IC₅₀ de 100 μ M en el ensayo *in vitro* de la actividad inhibidora de ACE, que también dio como resultado una disminución de la presión arterial sistólica de -25,62 mmHg cuando se prueba con ratas espontáneamente hipertensas. Por lo que respecta al modo de acción de los péptidos inhibidores de la ECA, 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). Sin embargo, la mayoría de estos péptidos comparten ciertas características estructurales como su longitud (2-15 residuos de aminoácidos) y la secuencia del tripéptido C-terminal, que suele contener prolina (Cheung et al., 1980).

Es bien conocida la presencia de péptidos antioxidantes de forma natural en la carne, aunque muchos de ellos se producen durante el proceso de curado. (Sarmadi y Ismail, 2010; Zhu et al., 2013; Zhu et al., 2016; Xing et al., 2016). Varios estudios describen que los péptidos antioxidantes pueden actuar como inhibidores de la peroxidación de lípidos, atrapadores de radicales libres y quelantes de iones metálicos de transición (Rajapakse et al., 2005; Qian et al., 2008). Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad (Chen et al., 1998). Treonina,

triptófano, metionina, lisina, cisteína e histidina son ejemplos de aminoácidos con actividad antioxidante (Wang y De Mejía., 2005). Además, los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar electrones a radicales con deficiencia de estos. Esta propiedad favorece la capacidad secuestradora 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. Recientemente, ha sido identificado en jamón curado el péptido antioxidante SNAAC que muestra un valor de IC₅₀ de 75,2 μ M y 205 μ M en el ensayo de captación de radicales DPPH y en el análisis del potencial reductor férrico, respectivamente (Mora et al., 2014).

El principal objetivo de este trabajo ha sido el estudio de las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los péptidos generados a partir de las proteínas sarcoplásmicas de jamón durante el proceso de curado y empleando la cromatografía de filtración en gel como método de fraccionamiento previo de los extractos peptídicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El estudio fue realizado por triplicado utilizando muestras de jamón curado obtenidas a partir de cerdos de 6 meses de edad del cruce Landrace x Large White. Se analizaron 3 muestras de músculo *Biceps femoris* de jamón tras 0, 3.5 y 10 meses de proceso.

Extracción de las proteínas

Una vez eliminada la grasa y el tejido conectivo, una muestra de músculo *B. femoris* se picó por métodos mecánicos, se tomaron 5 g, y se homogenizaron en 10 mL de tampón 50mM Tris-HCl, pH 8. El extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante que contenía las proteínas sarcoplásmicas, péptidos y aminoácidos, tras filtrarlo por lana de vidrio, se guardó a 4°C.

Cromatografía de exclusión molecular

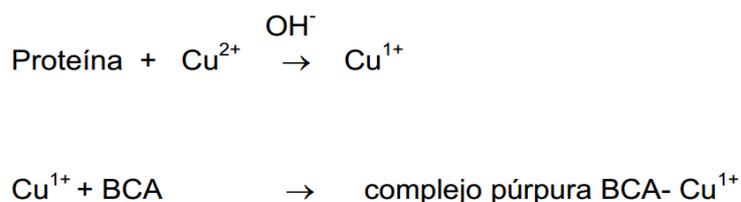
Esta cromatografía, también denominada cromatografía de filtración en gel, resulta muy útil en la separación de proteínas y péptidos en función de su tamaño molecular. La fase estacionaria es un gel con un intervalo de tamaño de poro controlado de manera que las moléculas más pequeñas se adentran en los poros del relleno y se retienen durante más tiempo mientras que las de mayor tamaño eluyen más rápidamente. En este trabajo se ha utilizado un cromatógrafo tipo ÄKTA start (G.E. Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA), que es un sistema de cromatografía líquida utilizado para la purificación preparativa de proteínas a escala de laboratorio. Funciona con una bomba peristáltica y la detección de proteínas se realiza por lectura UV a 280 nm. La columna empleada fue una Sephacryl S-100 (G.E. Healthcare Life Sciences) con un rango de trabajo de 100 a 1 KDa. La fase móvil consistió en un tampón fosfato 0,05M a pH 7 a un flujo de trabajo de 0,5 mL/min. Para el análisis de las muestras, 1 mL de los extractos de proteínas sarcoplásmicas se filtraron a

través de un filtro de membrana de nylon (0,20 µm), se inyectaron en el sistema y se recogieron fracciones de 5 mL (1 cada 10 minutos) utilizando un colector de fracciones 2110 de Bio Rad (Hercules, CA, USA).

Previo a la separación de las muestras, se realizó un calibrado de la columna, con empleando aldolasa, BSA, β-lactoglobulina, citocromo C, aprotinina y citidina.

Cuantificación de las proteínas sarcoplásmicas

La cuantificación de proteínas se realizó tanto en los extractos como en las fracciones recogidas durante la cromatografía de filtración en gel mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) que es capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} que se generan tras la reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret).



Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina se suero bovino (BSA) (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/mL). Para las muestras, se preparan diluciones 1:10, 1/25 y 1/50 de los extractos de proteínas sarcoplásmicas obtenidos. El análisis se realiza en placas multipocillo en las que 25 µL de patrón/muestra se mezclaron con 200 µL de reactivo BCA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en todos los pocillos, y tras incubación (60°C, 15 minutos) se midió la absorbancia a 570 nm. Las concentraciones de las muestras se determinaron a partir de la recta patrón obtenida con el estándar de BSA.

Cuantificación de aminoácidos libres

La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) es un oxidante energético que produce una desaminación oxidativa de los aminoácidos y conduce a la formación del aldehído correspondiente, con liberación de amoníaco y gas carbónico, y formación de la ninhidrina reducida o hidrindrantina. La molécula de hidrindantina, en presencia de otra de ninhidrina, condensa en presencia del amoníaco produciendo una estructura denominada indanona o púrpura de Ruhemann, de color rojizo.

La cuantificación del total de aminoácidos (expresado como µg/mL de leucina) presentes en las fracciones recogidas de las distintas muestras de jamón se realizó mediante la reacción de derivatización con Cadmio-Ninhidrina (Doi et al., 1981). Para preparar este reactivo, 2,4 g de ninhidrina se disuelven en 240 mL de etanol y se añaden 30 mL de ácido acético glacial. A continuación se añade 3 g de CdCl_2 disuelto en 3 mL de agua bidestilada. Un volumen de 800 µL de este reactivo se hacen reaccionar con 400 µL de muestra y se calienta a 84 °C durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se enfrían y se centrifugan (12000 rpm, 5 min, 4°C). Se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de Leucina (13,3; 26,6; 53,2; 79,8 µg/mL). Posteriormente se

transfiere a una placa multipocillo y se lee la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Baer et al., 1996).

Preparación de las fracciones para la bioactividad

Previo a los ensayos de actividad antioxidante e inhibición de la ECA, las fracciones recogidas durante el análisis cromatográfico se reagruparon en 10 nuevas fracciones desde el volumen 85 mL al volumen 180 mL. Estas fracciones fueron desproteinizadas con 3 volúmenes de etanol para posteriormente ser liofilizadas y resuspendidas en 400 µL de agua bidestilada para proceder a los ensayos pertinentes.

Evaluación de la actividad antioxidante de los péptidos.

Generalmente, el método ideal para la determinación de la actividad antioxidante 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). Por ello, las propiedades antioxidantes de un péptido no pueden evaluarse únicamente con un tipo de ensayo sino que deben evaluarse mediante varios métodos como son la capacidad para erradicar radicales libres, para actuar como quelantes de iones metálicos, atrapadores de oxígeno o donantes de hidrógeno, etc. Así pues, en este estudio se han utilizado varios métodos para estimar la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas del jamón curado.

ABTS

El ensayo ABTS ha sido aplicado a proteínas vegetales, tales como la soja, zeína y proteínas del arroz (Adebiyi et al., 2009; Hernández-Ledesma et al., 2010; Tang et al., 2010) 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 de la enzima 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^{•+}.

El radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,42mM) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm y 25°C. Así, 10 µL de muestra, control positivo (ácido ascórbico) y control negativo (PBS), fueron adicionados a 990 µL de la solución ABTS^{•+}, para tras 6 minutos ser leídos a una absorbancia de 734 nm.

Potencial reductor férrico (FRP)

Esta reacción se basa en la medida de la reducción de Fe(III) a Fe(II) en presencia de los compuestos antioxidantes gracias a la formación de un complejo coloreado que se mide por absorbancia (Pino Pérez F., 1973).

Este método se basa en la siguiente reacción química:





Brevemente, 70 μL de cada fracción de las muestras se mezclaron con tampón fosfato de sodio (70 μL , 200 mM, pH 6,6) y ferricianuro de potasio (70 μL , 10 mg / mL), la mezcla se incubó a 50°C durante 20 min. Posteriormente, se añadió ácido tricloroacético (70 μL , 100 mg / ml) y la mezcla se centrifugó a 200 g durante 10 min. El sobrenadante (200 μL) se mezcló con agua bidestilada (200 μL) y cloruro férrico (40 μL , 1 mg / mL) y se midió la absorbancia a 700 nm, frente a un blanco. Los valores de mayor absorbancia son indicativos de un mayor poder reductor. Como control negativo se utilizó agua bidestilada y como control positivo se utilizó butilhidroxitolueno (BHT). El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

ORAC

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 (Jensen, et al., 2009; Contreras et al., 2010; Zhang et al., 2010). 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 peroxilo 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 peroxilo (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.

Se siguió el procedimiento descrito por Ou et al. (2001) ligeramente modificado: 140 μL de la muestra o el blanco se mezclaron con 70 μL de una solución de 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride AAPH 80 mM y 70 μL de una solución de fluoresceína 200 nM. La fluorescencia se registró hasta que llegó a cero (longitud de onda de excitación 485 nm, longitud de onda de emisión 538 nm) en un espectrofotómetro de fluorescencia a 37°C.

Evaluación de la capacidad antihipertensiva de los péptidos.

La medida más utilizada para seleccionar péptidos con potencial antihipertensivo ha sido su capacidad para inhibir *in vitro* a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), clave en la regulación de la presión arterial por el sistema renina-angiotensina (RAS).

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

El ensayo se ha realizado según Sentandreu y Toldrá, (2006). Con este método el sustrato fluorogénico Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro, será hidrolizado por acción de la ECA, liberándose el compuesto fluorescente Abz-Gly-OH. Se preparó un mezcla de reacción de un volumen total de 250 μl , conteniendo 200 μl del sustrato fluorescente Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH, 0,45 mM (casa comercial) disuelto en tampón Tris-base 150 mM a pH 8,3 con NaCl 1,125 mM, 30 μl de la muestra o control y 20 μl de agua bidestilada La mezcla se preincubó en placas opacas de 96 pocillos durante 15 minutos a 37°C, tras los cuales se añadió 50 μl de ECA de riñón de cerdo con una actividad de 42.6 mU/mL. La placa se introdujo en un lector de fluorescencia, donde se incubó 30 minutos a 37°C. Cada 5 minutos se realizó una medida de la fluorescencia emitida (longitud de

onda de excitación 355 nm y longitud de onda de emisión 405 nm) lo que permitió calcular la actividad ECA (unidades de fluorescencia emitidas por unidad de tiempo). La actividad ECA en presencia de un inhibidor se expresó como porcentaje respecto a la actividad mostrada por la enzima en ausencia de inhibidor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación cromatográfica.

Previo al análisis cromatográfico de las muestras se realizó el calibrado de la columna de filtración en gel, Sephacryl S-100, empleando una serie de proteínas patrón que recogen todo el intervalo de masa molecular de trabajo de la columna, desde 100 a 1 KDa. Como marcador de volumen de exclusión se tomó la aldolasa, de masa molecular 164000 Da, mientras que por el otro extremo, para marcar el volumen de permeación se tomó la citidina de masa molecular 243 Da, tal como sugería el fabricante de la columna,.

La **Tabla 2** muestra la relación de proteínas utilizadas para el calibrado, sus masas moleculares, los volúmenes de elución (V_e) y coeficientes de reparto (K_a) obtenidos para la elaboración de la recta de calibrado.

Tabla 2. Datos para la recta de calibrado.

Patrones	Masa molecular (Da)	V_e	K_a
Aldolasa	≥ 100000	41,40	0,000
BSA	66300	47,24	0,074
β-lactoglobulina	35000	56,70	0,194
Citocromo	12400	71,30	0,379
Aprotinina	6500	100,10	0,745
Citidina	≤ 1000	120,20	1,000

(V_e) volumen de elución para cada proteína patrón.

(K_a) coeficiente de distribución de cada proteína.

Relacionando los volúmenes de elución de cada uno de los patrones con su masa molecular se consigue una ecuación (**ver Figura 2**) que servirá para estimar la masa molecular de las proteínas que se encuentran en la muestra.

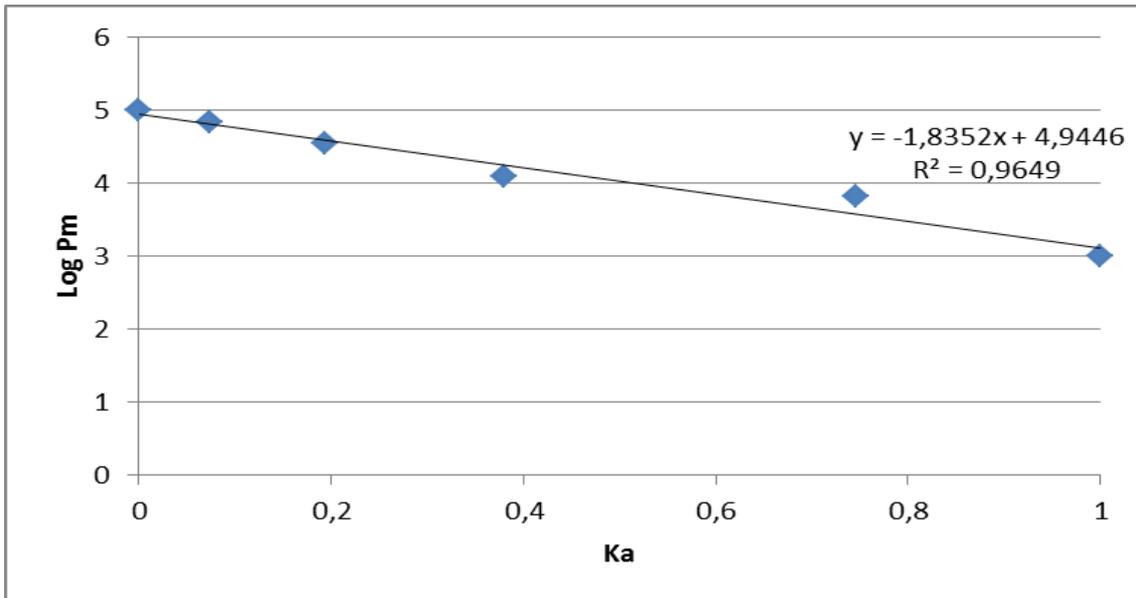


Figura 2. Recta de calibrado y ecuación.

Tras extraer las proteínas sarcoplásmicas de las muestras de jamón de 0; 3,5 y 10 meses de curado, se analizaron por CFG.

En los cromatogramas de la **Figura 3** vemos la distribución de proteínas de las muestras a los tres tiempos estudiados del proceso de curado del jamón.

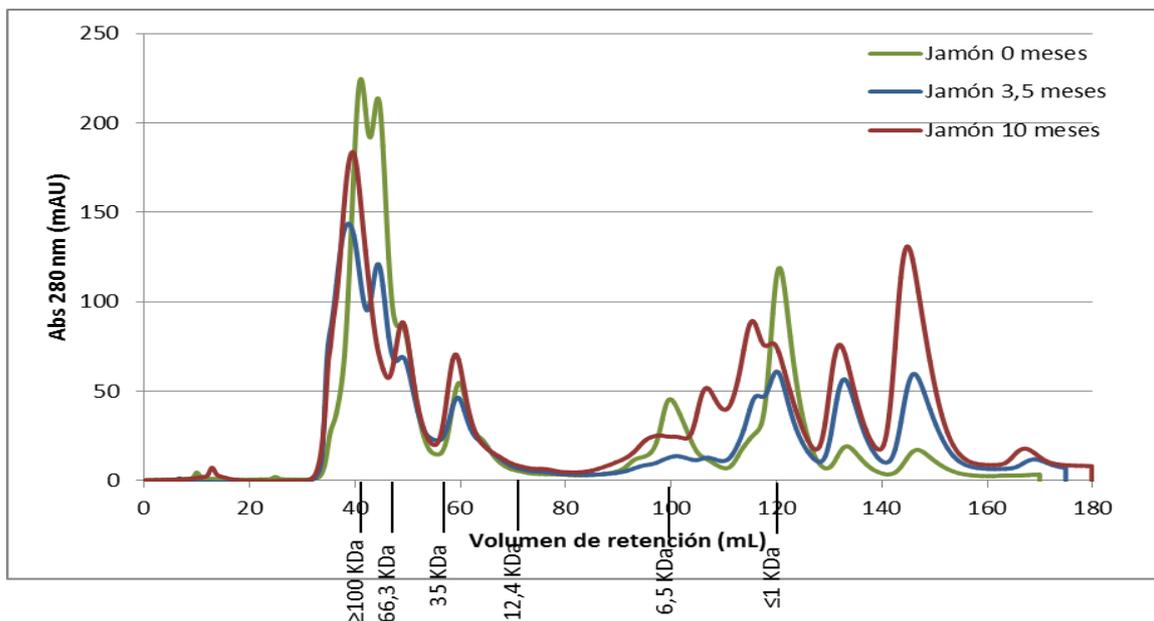


Figura 3. CFG del músculo B. femoris de jamón a diferentes tiempos de curado.

Conforme aumenta el tiempo de curado, cabe esperar que en la primera zona del cromatograma en la que eluyen las proteínas grandes, vaya disminuyendo la señal debido al avance de la proteólisis que tiene lugar durante el proceso. Sin embargo en el cromatograma del jamón 10 meses no se aprecia una disminución de la señal correspondiente a las proteínas de mayor tamaño, en relación a un jamón de 3,5 meses, debido muy probablemente a la hidrólisis de las proteínas de un tamaño superior a nuestro rango de columna, tanto sarcoplásmicas como miofibrilares que, de este modo se solubilizan y se

extraen junto con las sarcoplásmicas apareciendo en la fracción soluble del extracto (Córdoba et al., 1994; Toldrá & Flores., 1998; Larrea et al., 2006; Bermúdez et al., 2014).

Se puede apreciar un aumento de la cantidad y tamaño de picos hacia la parte final de los cromatogramas conforme va aumentando el tiempo de curado del jamón. El volumen de permeación de la columna es de 120 mL y corresponde a un tamaño de proteína de unos 1000 Da. Todo lo que aparece por detrás de ese volumen podrían ser péptidos con aminoácidos aromáticos, dado que éstos sufren interacciones con la matriz de la columna y retrasan su elución, especialmente el triptófano, si bien este efecto es más marcado en los péptidos más pequeños, teniendo menos importancia en péptidos más grandes y proteínas (Squire, 1964; Janson, 1967).

Para estudiar estas interacciones, se analizó el triptófano (W) y un péptido con distinta cantidad de aminoácidos aromáticos en su composición. En concreto el péptido TSNRYHSYPWG (1367,43 Da) en cuya estructura encontramos dos tirosinas (Y) y un triptófano (ver Figura 4).

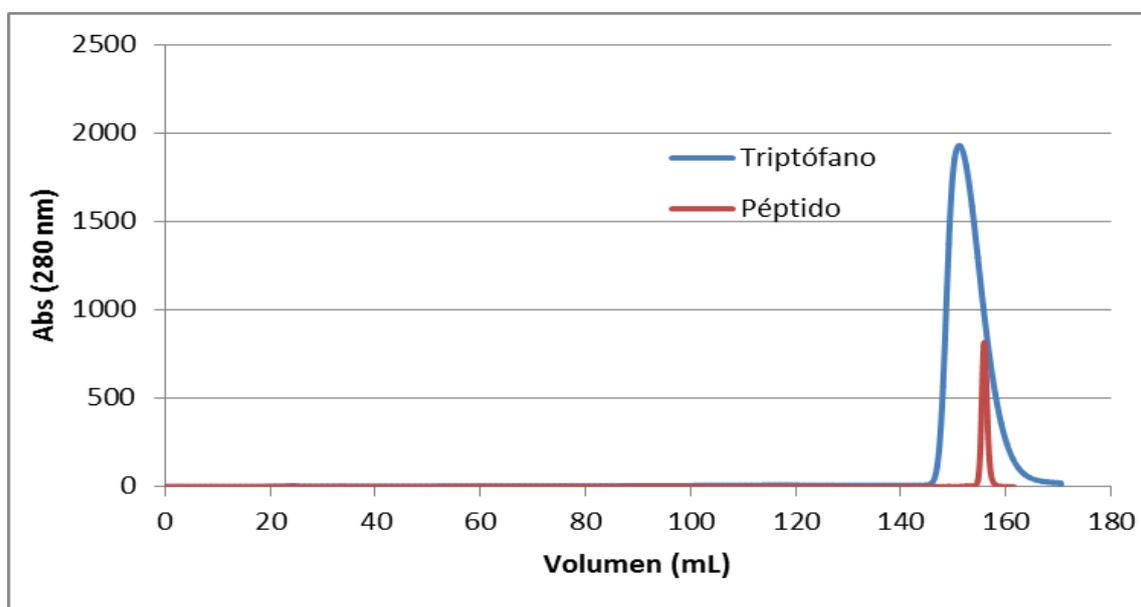


Figura 4. CFG de Trp y péptido con aminoácidos aromáticos TSNRYHSYPWG.

Este ensayo confirmó la mayor retención de los aminoácidos aromáticos en la columna, lo que nos indicó que el volumen de exclusión de la columna marcado por la citidina podría no ser real, ya que ésta tiene en su estructura un anillo aromático. Por otro lado, dado que la detección empleada es la lectura UV a 280 nm, a esa longitud de onda solo podemos detectar moléculas que tengan algún anillo aromático en su estructura. Así pues, para poder conocer el volumen de permeación real de la columna se midieron los aminoácidos libres no aromáticos en las fracciones resultantes de la cromatografía. Dichas fracciones se analizaron también en su contenido en péptidos y proteínas, por el método del BCA, para confirmar y completar los datos de lectura a 280 nm.

Cuantificación proteínas

Por lo que respecta a los resultados del contenido total de proteínas de la fracción soluble de las muestras cárnicas analizadas, se obtuvo un contenido

en proteínas de 15,97 g/100 g de jamón de 0 meses, 17,71 g/100 g de 3,5 meses y 30,58 g/100 g del jamón de 10 meses de curación. Estos resultados son ligeramente superiores a los encontrados en bibliografía (Belitz et al., 1997; Ordoñez et al., 1998) aunque estos valores son aproximados ya que pueden variar dependiendo de la raza, la alimentación del animal, el proceso de curado, etc.

En la **Figura 5** podemos observar la cantidad de proteína presente en las distintas fracciones de las muestras de jamón, tras la cromatografía. Si comparamos el jamón de 0 meses, vemos que hay más proteínas de mayor tamaño, de entre 100 y 40 KDa (fracciones 8-10 que corresponden a volúmenes de retención entre 40 y 50 mL) que en las muestras con mayor tiempo de curado y sin embargo hay menos proteínas de entre 30 y 10 KDa (fracciones 12 a 15 que corresponden a volúmenes de retención entre 60 y 75 mL), debido a que la proteólisis todavía se encuentra en una fase inicial.

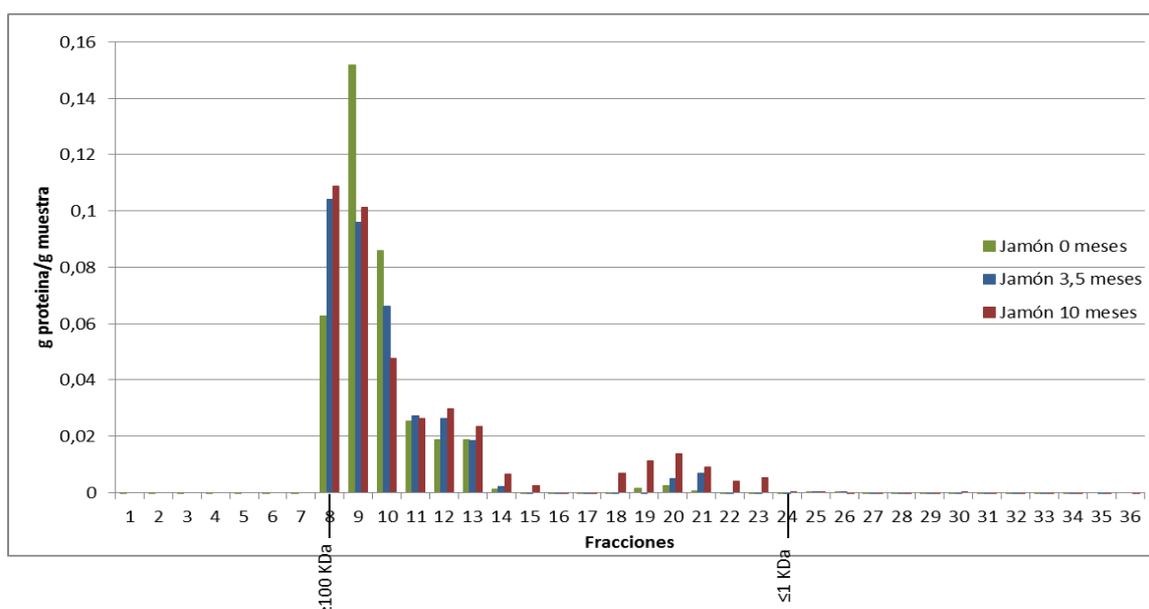


Figura 5. Representación gráfica del contenido proteico por fracciones de la CFG en músculo *Biceps femoris* de Jamón a distintos tiempos del proceso.

Como se comentó anteriormente, dada la intensa proteólisis que se ha descrito en el jamón curado (Córdoba et al., 1994; Toldrá & Flores., 1998; Larrea et al., 2006; Bermúdez et al., 2014), la presencia de gran cantidad de proteínas en las fracciones iniciales del jamón de 10 meses puede deberse a la solubilización de proteínas miofibrilares, que ha tenido lugar durante el proceso. Por lo que respecta a las fracciones entre la 18 y la 23 (volúmenes de retención de 80 a 115 mL) se observa un mayor valor en los tiempos de curado correspondientes a 3,5 y especialmente 10 meses, donde muy probablemente encontremos péptidos pequeños resultantes de la proteólisis.

Podemos observar que no se ha cuantificado ningún tipo de proteína a partir de la fracción 23 que correspondería a un volumen de elución en el cromatograma de 115 mL, donde observamos que sí que se detectan picos cromatográficos, (ver **Figura 2**) esto se debe a que en estas fracciones encontramos mayoritariamente gran cantidad de aminoácidos aromáticos

libres, así como otros compuestos con aromáticos en su estructura que no van a ser cuantificados con el BCA.

Cuantificación de aminoácidos libres

La posición de los aminoácidos libres no puede verse ni en el cromatograma, obtenido a 280 nm (únicamente los aminoácidos aromáticos pueden verse a esta longitud de onda), ni en los análisis de las fracciones por BCA, ya que éste solo cuantifica enlaces peptídicos. Se supone que por tamaño molecular, deberían salir hacia los 120 mL (fracción 24). Para confirmar este hecho, se analizaron las fracciones recogidas calculando el total de aminoácidos en éstas, mediante reacción de derivatización con Cadmio-Ninhidrina (expresado como leucina).

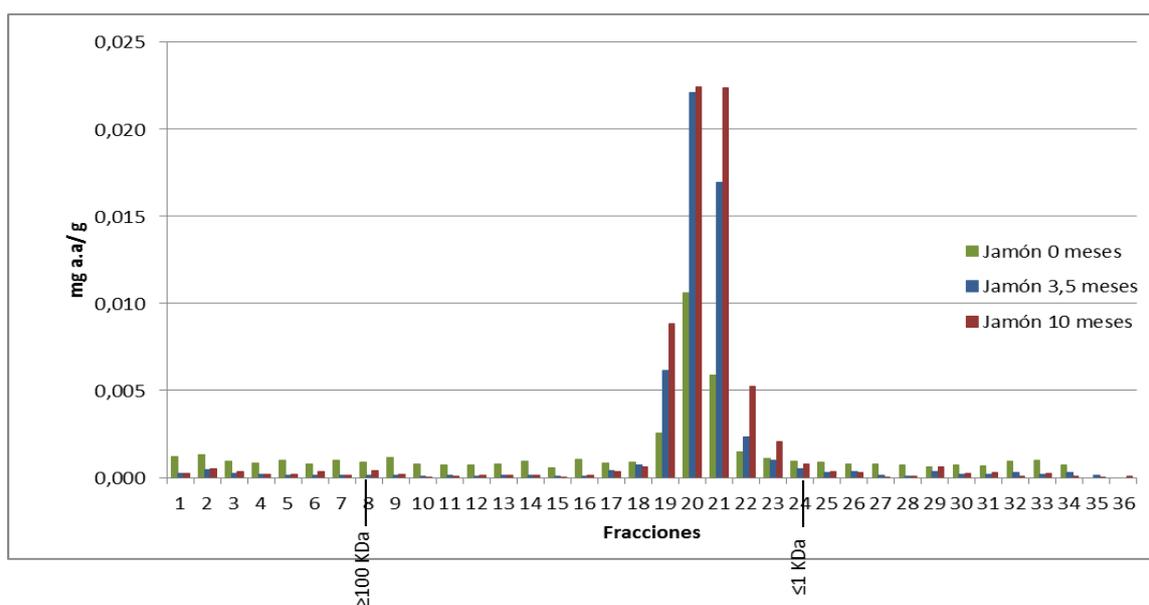


Figura 6. Representación gráfica del contenido de aminoácidos libres por fracciones de la CFG en músculo *Biceps femoris* de Jamón a distintos tiempos del proceso.

En la **Figura 6** se observa como la mayor cantidad de aminoácidos libres se encuentra en la fracción 20, por lo que se puede presuponer como cierta la hipótesis de que el volumen de exclusión de la columna corresponde más a un volumen de 100 mL, y que por lo tanto el patrón usado (citidina) queda ligeramente retenido debido muy probablemente a la presencia de aromáticos en su estructura.

Ensayo de la actividad antioxidante

Como se ha explicado en la introducción, los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar electrones a radicales deficientes de electrones, por lo que los péptidos con este tipo de aminoácidos en su estructura pudieran ser de interés por sus posibles propiedades antioxidantes. Así pues, demostrada la retención de ciertos péptidos y aminoácidos con grupos aromáticos en la columna, y que por tanto el volumen de exclusión real correspondería a un volumen de 100 mL, se decide utilizar para el ensayo de la actividad antioxidante las fracciones recogidas durante el análisis cromatográfico

reagrupadas en 10 nuevas fracciones desde el volumen 85 mL al volumen 180 mL (ver Figura 7).

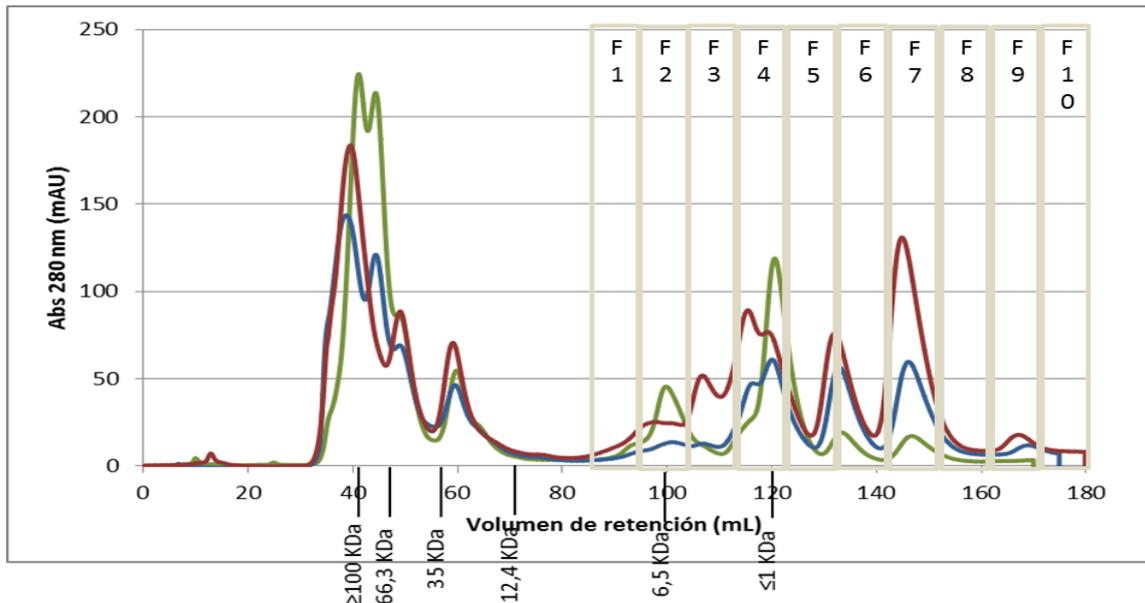


Figura 7. Reagrupación de fracciones para el análisis de péptidos.

ABTS

Para este ensayo se midió el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra frente al ABTS^{•+}. Se analizaron las fracciones reagrupadas según el apartado anterior.

En la siguiente grafica podemos observar el porcentaje de inhibición obtenido en las fracciones analizadas, junto con el ácido ascórbico como control positivo.

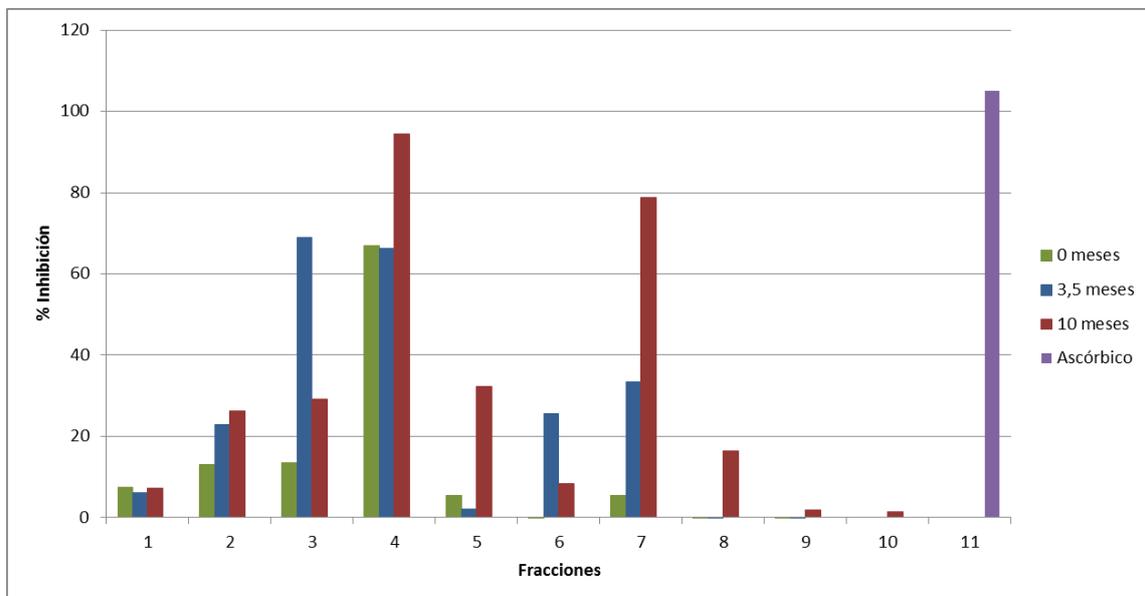


Figura 8. Representación gráfica de la actividad antioxidante de las fracciones de la CFG por ABTS en músculo *Biceps femoris* de jamón a distintos tiempos del proceso.

De forma general, el mayor porcentaje de inhibición se observa en la fracción 4, aunque hay que destacar porcentajes de inhibición relativamente altos en la fracción 3 por lo que respecta al jamón de 3,5 meses, así como en la fracción 7 del jamón de 10 meses.

Además, cabe considerar el progresivo aumento en cuanto a capacidad antioxidante de los tiempos de curado 3,5 y 10 meses con respecto a los 0 meses debido a la intensa proteólisis generada durante este proceso, lo que explica un mayor número de péptidos con capacidad antioxidante.

Poder reductor férrico (FRP)

Como se observa en la **Figura 9**, la mayor capacidad antioxidante testada mediante este ensayo se produce en la fracción 3, aunque se observa una capacidad antioxidante interesante en las fracciones 2 y 4, sobretudo en el jamón de 10 meses de curación.

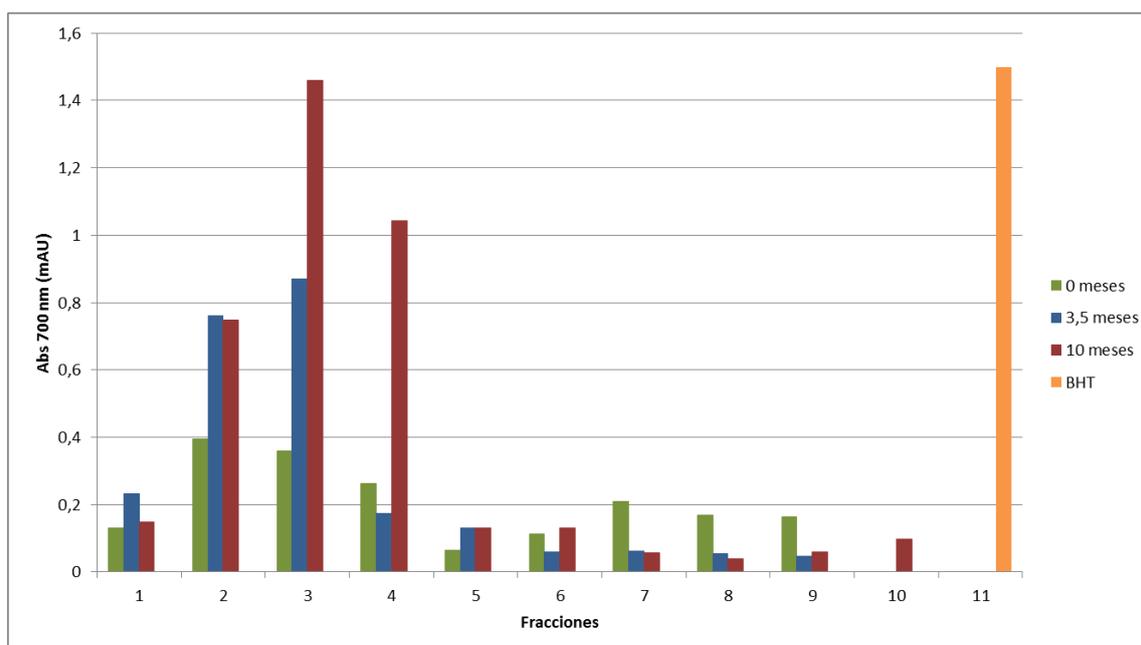


Figura 9. Representación gráfica de la actividad antioxidante de las fracciones de la CFG por FRP en músculo *Biceps femoris* de Jamón a distintos tiempos del proceso.

Al igual que en el ensayo anterior se observa un progresivo aumento en cuanto a capacidad antioxidante de los tiempos de curado 3,5 y 10 meses con respecto a los 0 meses.

ORAC

En la **Figura 10** se observan los resultados tras analizar la capacidad de absorción de radicales en oxígeno a las fracciones de jamón a los distintos tiempos de curado.

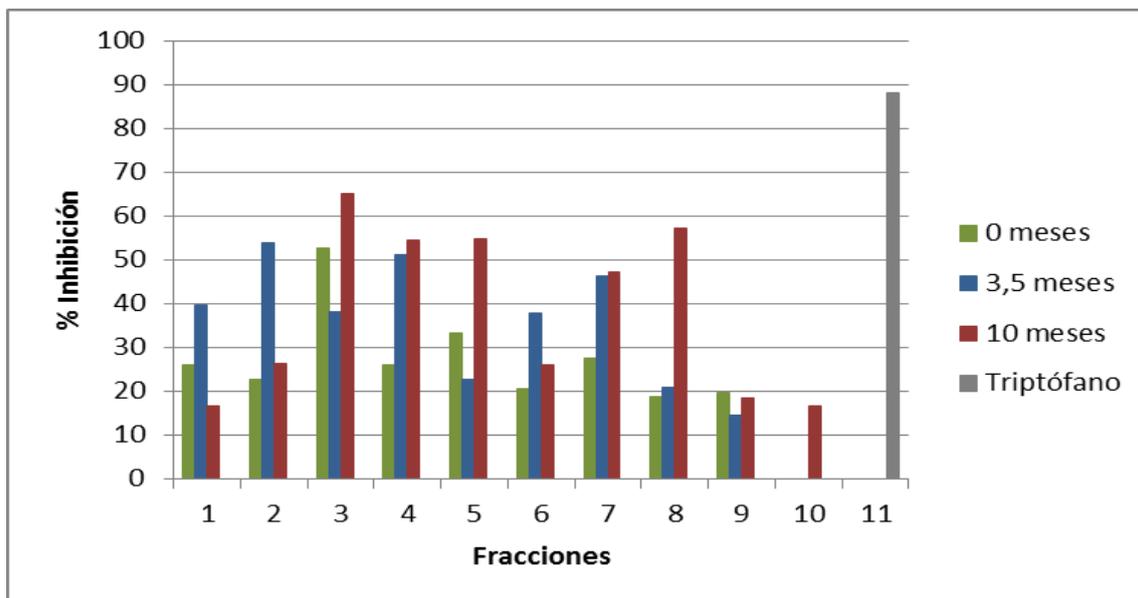


Figura 10. Representación gráfica de la actividad antioxidante de las fracciones de la CFG por ORAC en músculo *Biceps femoris* de Jamón a distintos tiempos del proceso.

El mayor porcentaje de inhibición se encuentra en la fracción 3, coincidiendo con el ensayo del poder reductor férrico, aunque debido a la sensibilidad del presente método se observan una mayor actividad en el resto de fracciones.

Por lo que respecta a la diferencia entre tiempos de curado, al igual que el resto de ensayos de capacidad antioxidante, es mayor conforme avanza el proceso de curado, debido como hemos comentado anteriormente a la generación de péptidos con actividad antioxidante como resultado de la proteólisis.

Los resultados obtenidos concuerdan con los porcentajes de actividad antioxidante mostrados en fracciones de estudios realizados con anterioridad en jamón curado (Mora et al., 2014; Xing et al., 2016; Zhu et al., 2016). Así, por ejemplo, Escudero et al., (2013) obtuvieron valores de actividad antioxidante de entre el 39% y el 92% en función de la fracción analizada por el método DPPH.

Evaluación de la actividad antihipertensiva de los péptidos.

En cuanto a la determinación de péptidos con actividad antihipertensiva, su actividad se vincula tanto al tamaño como a la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en su grupo C-terminal (Cheung et al., 1980). Es por esto, que se decide utilizar el mismo criterio de selección de fracciones que el realizado para la evaluación de la actividad antioxidante (**ver Figura 7**), ya que se asume como muy probable la hipótesis de que estos péptidos se distribuyan en las fracciones del cromatograma de una forma muy similar a como lo hacen los péptidos con actividad antioxidante.

ECA

En la **Figura 11** se aprecia como el mayor porcentaje de inhibición lo encontramos en la fracción 2, aunque en la fracción anterior y posterior se observan porcentajes de inhibición nada despreciables, sobre todo en los tiempos de curado de 3,5 y 10 meses.

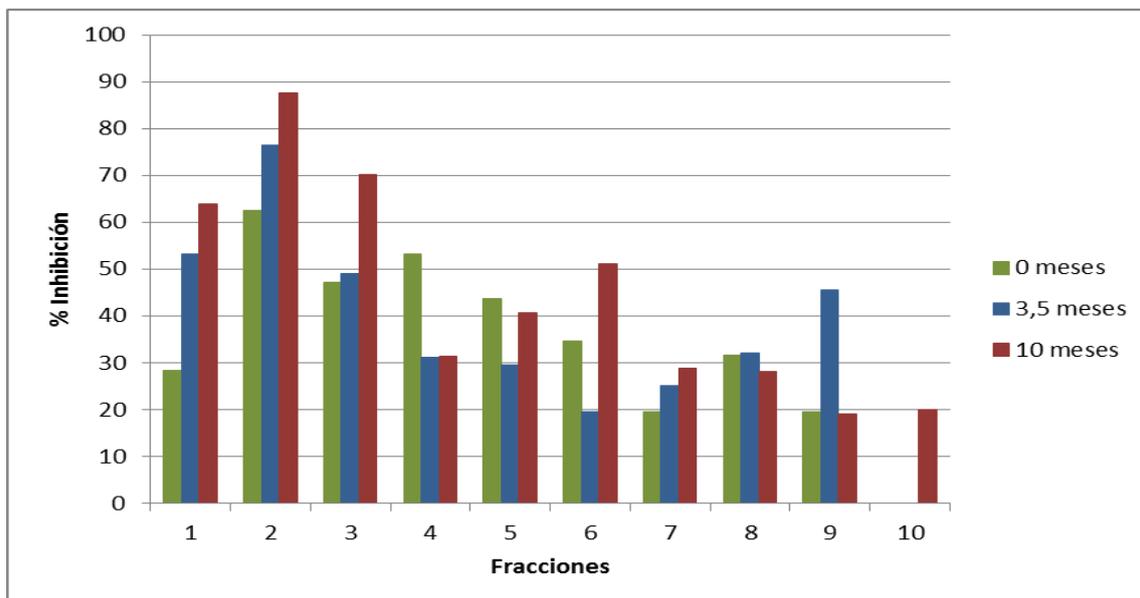


Figura 11. Representación gráfica de la capacidad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina de las fracciones de la CFG en músculo *Biceps femoris* de Jamón a distintos tiempos del proceso.

De forma general, como ocurre en los ensayos de capacidad antioxidante, se da una mayor actividad inhibidora de la enzima ACE en el jamón de 10 meses, debido al avance de la proteólisis, que ha generado un mayor número de péptidos con dicha actividad. Los resultados obtenidos son muy similares a los descritos en otros estudios en jamón curado (Escudero et al., 2012; Mora et al., 2015).

CONCLUSIONES

La cromatografía de filtración en gel empleando una columna Sephacryl S-100 y realizada en un equipo de cromatografía ÄKTA Start demostró ser un método rápido y sencillo de fraccionamiento de un extracto peptídico para el estudio de las actividades antioxidante e inhibidora de la enzima ACE de los péptidos que lo componen.

La metodología utilizada confirmó la intensa hidrólisis sufrida por las proteínas sarcoplásmicas, observándose un aumento de proteínas y péptidos de menor tamaño a lo largo del proceso de curado de jamón.

Los compuestos con grupos aromáticos sufrieron una ligera interacción con la matriz de la columna, y un consiguiente retraso en la elución, que hay que tener en cuenta cuando se asignan tamaños moleculares en función de los volúmenes de retención.

Los ensayos de actividad antioxidante y antihipertensiva, realizados en las fracciones recogidas confirman que el jamón es una buena fuente de péptidos bioactivos. Dicha bioactividad es más intensa al final del proceso, pero también es importante en las etapas intermedias.

REFERENCIAS

- 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.
- Arihara, K. (2006) Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.
- 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.
- Aristoy, M.C., y Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: Generation, analysis and processes influence* (pp. 1323-1344). Amsterdam: Elsevier Science.
- Belitz, H. D. & Grosch, W. (1997). "Química de los alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza.
- Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., Sentandreu, M. A., & Lorenzo, J. M. (2014). Influence of muscle type on the evolution of free amino acids and sarcoplasmic and myofibrillar proteins through the manufacturing process of Celta dry-cured ham. *Food Research International*, 56, 226-235.
- 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.
- 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.
- Cheung, H-S.; Wang, F-L.; Ondetti, A. M.; Sabo, F. Emily.; Cushman, W. David. 1980. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Importance of the COOH-Terminal Dipeptide Sequence. *The Journal of Biological Chemistry* 255(2), 401-407.
- 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.
- Córdoba, J. J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C., García, C., & Asensio, M. A. (1994). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 37, 217-227.
- Doi, E., Shibata, D. & Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal Biochem.*, 118, 173-184.
- Escudero E, Mora L, Fraser PD, Aristoy MC, Arihara K, Toldrá F. (2013). Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *J Proteomics*, 78, 499-507.
- Escudero, E. Aristoy, M.C., Hitoshi N., Arihara, K. & Toldrá, F. 2012. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Sci.* 306-311.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M.C. & Toldrá, F. 2013. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chem.* 138, 1282-1288.
- 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.
- 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.
- 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.
- Janson, J. C. (1967). Adsorption phenomena on Sephadex. *Journal of Chromatography*, 28, 12-20.

Jensen, J.J., Abrahamsen, H., Mæhre, 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.

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.

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 (24), 6992-6997.

Larrea, V., Hernando, I., Quiles, A., Lluch, M. A., & Perez-Munera, I. (2006). Changes in proteins during Teruel dry-cured ham processing. *Meat Science*, 74, 586-593.

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.

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.

Mora, L., Escudero, E., Arihara, K. & Toldrá, F. 2015. Antihypertensive effect of peptides naturally generated during Iberian dry-cured ham processing. *Food Research International*, 78, 71–78.

Mora, L., Escudero, E., Fraser, P.D., Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (2014). Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International*, 56, 68–76.

Mora, L., Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Toldrá, F., y Bramley, P. M. (2009b). Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in Spanish dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (19), 8982-8988.

Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F., y Bramley, P. M. (2009a). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (8), 3228-3234.

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., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Sentandreu, M. A., y Toldrá, F. (2011). Small peptides released from muscle glycolytic enzymes during dry-cured ham processing. *Journal of Proteomics*, 74 (4), 442-450.

Mora, L., y Toldrá, F. (2012). Proteomic identification of small (<2000 da) myoglobin peptides generated in dry-cured ham. *Food Technology and Biotechnology*, 50 (3), 343-349.

Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G., de la Hoz, L. y Selgas, M.D. (1998). *Tecnología de los Alimentos. Volumen I: Componentes de los alimentos y procesos*. Eds, Ordóñez, J.A Ed. Síntesis: Madrid.

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.

Pino Pérez F. (1973). *Técnicas Experimentales de Análisis Cualitativo*. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Sevilla.

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.

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.

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, 175-82.

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

Sarmadi, B.H., Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* (2010), J.peptides, 31, 1949–1956.

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.
- Squire, P. G. (1964). A Relationship between the Molecular Weights of Macromolecules and Their Elution Volumes Based on a Model for Sephadex Gel. *Archives of biochemistry and biophysics*, 107, 471-478.
- 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., Aristoy, M. C., y Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33 (3-4), 181-185.
- 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 and Nutrition*, 38 (4), 331-352.
- Valcárcel P, Lemus Y. (2004). El Potencial Reductor Férrico (FRP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero. *Corr Cient Med Holguín* 8: 1-4.
- Vercruysse, L., Van Camp, J., Smagghe, G. (2005). Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106-8115.
- Vermeirssen, V., Camp, J.V., Verstraete, W. (2007). Bioavailability of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- 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.
- Xing, L-J., Hu, Y-Y., Hu, H-Y., Ge, Q-F., Zhou, G-H., Zhang, W-G. (2016). Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei ham. *Food Chemistry*, 194, 951–958.
- 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.
- Zhu, C-Z., Zhang, W.-G., Zhou, G.-H. Xu, X.-L., Kang, Z.-L. & Yin, Y. (2013). Isolation and Identification of Antioxidant Peptides from Jinhua Ham. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1265–1271.
- Zhu, C-Z., Zhang, W-G., Zhou, G-H., & Xu, X-L. (2016). Identification of antioxidant peptides of Jinhua ham generated in the products and through the simulated gastrointestinal digestion system. *J Sci Food Agric*, 96, 99–108.