



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS PRECURSORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Eylon Manuela Sánchez

TUTOR(ES): Dr. Fidel Toldrá Vilardell
Dra. Leticia Mora Soler
Dr. Pau Talens Oliag

Curso Académico: 2016-17

VALENCIA, 4 DE JULIO DE 2017

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS PRECURSORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Eylen Manuela Sánchez, Leticia Mora Soler¹, Fidel Toldrá Vilardell¹, Pau Talens Oliag².

RESUMEN

La metodología tradicional para la obtención de péptidos bioactivos consiste en la selección de una proteína, la optimización de la hidrólisis enzimática, la separación y purificación del extracto peptídico obtenido y, finalmente, el ensayo *in vitro* de las distintas actividades biológicas para confirmar si la proteína y la enzima propuestas son las adecuadas para generar los péptidos bioactivos. Sin embargo, este flujograma de trabajo puede ser simplificado mediante el análisis *in silico* por medio de herramientas como UniProt, Peptide Cutter (ExpASY) y BIOPEP. Estas herramientas permiten realizar una predicción teórica del potencial de diferentes secuencias de proteínas conocidas para generar péptidos bioactivos utilizando enzimas de especificidad conocida.

Los objetivos principales del presente estudio fueron a) la utilización de metodologías *in silico* para la selección de una proteína y de la enzima adecuada para la liberación de péptidos inhibidores de DPP-IV y con actividad antioxidante; b) la simulación de la digestión *in silico* para generar hidrolizados a partir de la proteína del suero de la leche seleccionada; c) confirmación *in vitro* de los péptidos inhibidores de DPP-IV y actividad antioxidante a partir de los hidrolizados reales.

Palabras Clave: Péptidos bioactivos, herramientas bioinformáticas, hidrólisis enzimática.

RESUM

La metodologia tradicional per a l'obtenció de pèptids bioactius consisteix en la selecció de la proteïna, l'optimització de la hidròlisi enzimàtica, la separació i purificació de l'extracte peptídic obtingut il assaig *in vitro* de les distintes activitats biològiques per a confirmar si la proteïna i l'enzim proposades són les adequades per a generar els pèptids bioactius. No obstant això, aquest flujograma de treball pot ser simplificat per mitjà de ferramentes d'anàlisi *in silico*, com ara: UniProt, Peptide Cutter (ExpASY) i BIOPEP. Estes ferramentes permeten realitzar una predicció teòrica del potencial de diferents

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España

²Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46011, Valencia, España

substrats amb seqüències de proteïnes conegudes per a generar pèptids bioactius, utilitzant enzims amb especificitat coneguda.

Principals objectius del present estudi varen ser: a) l'aplicació de mètodes *in silico* per a seleccionar tant la proteïna (a partir de proteïnes de sèrum de la llet) com l'enzim adequada per al seu ús en l'alliberament de pèptids inhibidors de DPP-IV i amb activitat antioxidant; b) l'utilització de l'enzim triada per a generar hidrolitzats a partir de la proteïna del sèrum de la llet seleccionada; c) la confirmació *in vitro* dels pèptids inhibidors de DPP-IV i activitat antioxidant a partir dels hidrolitzats.

Paraules Clau: Pèptids bioactius, ferramentes bioinformàtiques, hidròlisi enzimàtica.

ABSTRACT

Conventional methodology focused on the generation bioactive peptides consists in the selection of the protein substrate and the proteolytic enzyme. Following selection of the substrate and enzyme suitable, the hydrolysis conditions need to be chosen preparation for hydrolysate generation (optimization of the *in vitro* generation protein hydrolysates), peptide identification followed by verification *in vivo* with hydrolysates to confirm if the proposed protein and enzyme are suitable for generating the bioactive peptides. However, this workflow can be simplified by using analysis *in silico* and tools such as: UniProt, Peptide Cutter (Expasy) and BIOPEP. These tools allow for the theoretical prediction of potential of different substrates with known protein sequences to generate bioactive peptides, using enzymes with known cleavage specificities.

Thus, objectives of this study were a) To use *in silico* methods to select both protein (from whey protein) and enzyme suitable for use in the generation of peptides DPP-IV inhibitory and antioxidant activity; b) To use the chosen enzyme to generate hydrolysates from chosen protein (from whey protein); c) Verification *in vitro* of peptides DPP-IV inhibitory and antioxidant activity from hydrolysates.

Keywords: Bioactive peptides, bioinformatic tools, enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas las proteínas de los alimentos han ganado importancia no solo por su alto valor nutricional (composición en aminoácidos y biodisponibilidad) sino porque éstas pueden ser precursoras de péptidos con actividad biológica (antihipertensivos, antioxidantes, hipoglicémicos, opioides, anticolesterolémicos, antimicrobianos, inmunomoduladores, secuestradores de minerales, anti-cáncer, entre otros) (Agyei & Danquah, 2011); (Panchaud, y otros, 2012). Dichos péptidos se encuentran inactivos dentro de la secuencia de la proteína, pero pueden ser liberados durante el proceso de elaboración o tratamiento de los alimentos: hidrólisis enzimática, fermentación microbiana y/o procesos físicos (altas presiones, sonicación, etc.); (Rodríguez, y otros, 2014); (Nongonierma & FitzGerald, 2017).

Debido a la gran relevancia de estos péptidos, se han desarrollado técnicas para su obtención y con ello, un aumento en el número de estudios enfocados en la identificación de péptidos bioactivos. El número de publicaciones que se han llevado a cabo durante el periodo 2008 y 2016 con relación al estudio de péptidos, campo de investigación conocido como peptidómica manifiesta que existe un interés particular en la identificación y cuantificación de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias como lo son las proteínas de la leche (**FIGURA 1.**); los péptidos bioactivos derivados de los alimentos suelen presentar cadenas cortas de aminoácidos, de 2 a 20 aminoácidos, aunque algunas veces pueden ser más extensas. Hasta la fecha, las proteínas de la leche son consideradas unas de las mejores fuentes alimentarias de péptidos bioactivos (Nongonierma & FitzGerald, 2016); (Hafeez, y otros, 2014).

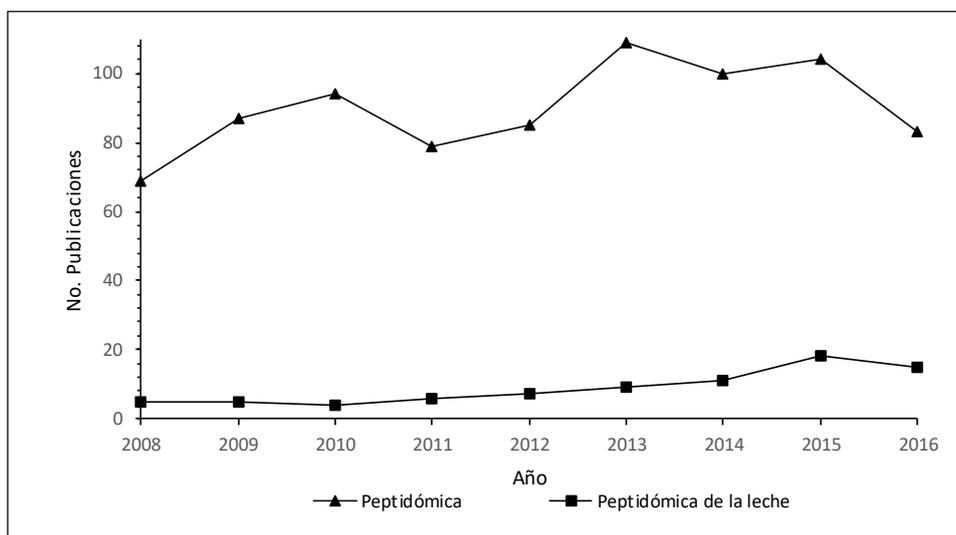


FIGURA 1. Número de publicaciones que utilizan el término “peptidómica” y “peptidómica de la leche” en literatura científica. Se realizó búsqueda en Scopus (<https://www.scopus.com>) con los términos y se graficó el periodo 2008 a 2016.

Actualmente, la mayoría de estudios centrados en la obtención e identificación de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias están basados en estrategias empíricas siguiendo un enfoque convencional, que

consiste en la liberación no orientada de los posibles péptidos bioactivos y, posteriormente, la evaluación de la bioactividad de los péptidos generados mediante técnicas *in vitro* (Nongonierma & FitzGerald, 2017), lo que conlleva a múltiples experimentos y análisis.

Pese a la prevalencia de los enfoques empíricos, en los últimos años las herramientas bioinformáticas han ganado importancia en el descubrimiento de péptidos bioactivos mediante la predicción de su actividad biológica y la optimización del procedimiento empírico a través de la aplicación de análisis *in silico*, modelos de relación actividad-estructura, quimiometría y administración de bases de datos de péptidos (Sánchez, y otros, 2014).

Las metodologías *in silico* se han basado en la información biológica reunida en distintas bases de datos, permitiendo llevar a cabo un análisis previo al estudio experimental como herramienta de predicción rápida para: (i) conocer la estructura y secuencia de la proteína/péptido y simular u optimizar procesos de hidrólisis de proteínas con el fin de predecir los aminoácidos/péptidos liberados al hidrolizar la secuencia de la proteína con una o más enzimas e (ii) identificar péptidos con potencial actividad biológica y predecir propiedades bioactivas de los péptidos (Carrasco, y otros, 2012).

Tulipano, y otros (2015) evaluaron la β -Lactoglobulina (β -Lg) y α -Lactoalbúmina (α -La) como proteínas con un elevado potencial como fuente de péptidos con actividad inhibidora de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV) utilizando herramientas bioinformáticas especializadas en digestiones *in silico*; sugiriendo que existe una relación entre el potencial como precursoras de péptidos bioactivos después de la digestión enzimática (pepsina, tripsina o tripsina y quimotripsina) y el número de péptidos bioactivos liberados. Sin embargo, para determinar si una proteína es potencialmente precursora de péptidos bioactivos, el número de péptidos liberados no es un factor adecuado para determinarlo, siendo más preciso aplicar posteriores herramientas bioinformáticas para analizar el potencial bioactivo de los péptidos generados (Vermeirssen, y otros, 2004); (Nongonierma & FitzGerald, 2017) y finalmente, una confirmación mediante evaluaciones *in vitro* (Cheung, y otros, 2009).

En relación con los antecedentes planteados, para el desarrollo del presente trabajo se estudió el uso de herramientas bioinformáticas mediante un análisis *in silico* en la evaluación de proteínas del suero de la leche como portadoras de péptidos con actividad antioxidante e inhibidores de DPP-IV.

Tras esto, se procedió con la hidrólisis enzimática *in vitro* de la proteína con la enzima seleccionadas. Y se confirmó la actividad biológica *in vitro*. En concreto, se determinó actividad antioxidante con dos metodologías: decoloración con el radical catión ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) y FRAP (por sus siglas en inglés: Ferric Reducing Antioxidant Power) e inhibición de la enzima DPP-IV. Finalmente, se obtuvo el perfil peptídico de los hidrolizados por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) y se identificaron las secuencias por espectrometría de masas (MS).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estrategia experimental *in silico*

Se realizó una búsqueda bibliográfica intensiva para conocer y clasificar las herramientas descritas hasta el momento útiles para el desarrollo de una estrategia experimental *in silico*, desde la obtención de la secuencia de la proteína objeto de estudio hasta la simulación de su hidrólisis con el fin de predecir los péptidos liberados. Además, se estudiaron las posibles herramientas informáticas disponibles para la evaluación de la bioactividad de estos péptidos teóricos.

Tras evaluar estas herramientas, por medio de bases de datos científicas se obtuvieron las secuencias de aminoácidos que conforman las principales proteínas del suero de la leche: α -Lactoalbúmina (α -La), β -Lactoglobulina (β -Lg) y Albúmina de Suero Bovino (ABS). Una vez conocidas las secuencias, se realizaron hidrólisis enzimáticas *in silico* con herramientas como BIOPEP y PeptideCutter de ExPASy.

2.2. Ensayo *in vitro*

2.2.1. Reactivos

Para la generación de péptidos bioactivos se empleó como sustrato Lactoalbúmina (α -La) de suero de leche bovina ($\approx 80\%$ de proteína) y la enzima termolisina de *Geobacillus stearothermophilus* de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EEUU). Respecto a los químicos empleados para los ensayos de actividad antioxidante, cloruro de hierro hexahidratado, 2,2-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), L(+)-ácido ascórbico de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EEUU), persulfato potásico, sodio di-hidrógeno fosfato, di-sodio hidrógeno fosfato anhidro, potasio di-hidrógeno fosfato anhidro, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), butilhidroxitolueno (BHT) de Panreac Química, S.A.U. (Barcelona, España), ácido tricloroacético (TCA) de Scharlau Chemicals S.A. (Barcelona, España); para el ensayo de inhibición de DPP-IV se utilizó enzima DPP-IV (de riñón porcino), Diprotin A (Ile-Pro-Ile), Gly-Pro-AMC, y ditiotreitól (DTT) de SigmaAldrich, Co. (St. Louis, MO, EEUU). Tris (hidroximetil) amino metano de Panreac Química, S.A.U. (Barcelona, España), ácido trifluoroacético (TFA) de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EEUU), acetonitrilo de VWR International S.A.S. (Fountenay sous bois, Francia), agua bidestilada producida en el laboratorio por sistema de purificación de agua Milli-Q®Integral (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), etanol al 96%, hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl).

2.2.2. Digestión enzimática de α -La con la enzima termolisina

La hidrólisis enzimática de Lactoalbúmina con termolisina se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por (Hernández-Ledesma, y otros, 2005) y (Hernández-Ledesma, y otros, 2006) con ligeras modificaciones. Brevemente,

se preparó una solución de α -La a una concentración 5 mg/mL en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) y la enzima se preparó a una concentración de 10 mg/mL en agua bidestilada; la solución de la enzima fue adicionada a la solución de la proteína en una relación 1:50.

Las hidrólisis enzimáticas se procesaron a tres temperaturas diferentes: 37, 55 y 70 °C, y siete tiempos de reacción: t_0 : 0 min., t_1 : 15 min., t_2 : 30 min., t_3 : 1 hora, t_4 : 2 horas, t_5 : 3 horas y t_6 : 24 horas. Previo a la etapa de adición de la enzima, el sustrato se acondicionó de acuerdo con la temperatura a la cual se llevó a cabo la reacción enzimática (37, 55 y 70 °C) durante 30 minutos.

La reacción enzimática se detuvo calentando a 95 °C durante 90 segundos.

Por otro lado, se procesó en paralelo a la digestión enzimática realizada a 37 °C una hidrólisis enzimática cuya solución tampón consistió en Tris-HCl 50 mM (pH 8) con CaCl_2 10 mM. El objetivo era comprobar la efectividad del ion calcio (Ca) al aplicarse en la mezcla de reacción como estabilizador de la termolisina (Roche & Voordouw, 1978).

Los ensayos se realizaron en un reactor tipo Carousel 6 Plus (Radleys, EEUU) con agitación constante (600 rpm) y temperatura constante y controlada. También, se procesó una muestra control de solución de proteína como referencia para cada ensayo realizado.

2.2.3. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada en triplicado utilizando dos métodos diferentes. Rápidamente, los hidrolizados previamente congelados a -80 °C y liofilizados fueron disueltos en 800 μL de agua bidestilada y centrifugados (10000 rpm, 10 minutos, -6 °C) en una micro-centrifuga Microfuge 22R (Beckman Coulter, Inc., California, EEUU) para separar el sobrenadante y proceder con los ensayos de actividad antioxidante.

2.2.3.1. Ensayo FRAP

El poder reductor se mide con base en la capacidad de reducir el hierro férrico a hierro ferroso (Huang, y otros, 2006). Este ensayo se llevó a cabo mezclando 70 μL de cada muestra con 70 μL de tampón fosfato (200 mM, pH 6.6) y 70 μL ferricianuro de potasio (10 mg/mL). La mezcla se incubó a 50 °C durante 20 minutos y se añadieron 70 μL de ácido tricloroacético (100 mg/mL); luego, la mezcla fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 min.

A continuación, en placa multipocillo se depositó 120 μL del sobrenadante, 120 μL de agua bidestilada y 24 μL de cloruro férrico (1 mg/mL). La absorbancia se midió a 700 nm en lector de microplaca Opsys MR (Dynex Technologies, Virginia, EEUU) después de 10 minutos de incubación en oscuridad. Los valores de absorbancia más altos indicaron mayor potencial reductor de hierro. Se utilizó BHT como control positivo.

2.2.3.2. Ensayo de decoloración con el radical catión ABTS⁺

El ensayo ABTS se realizó de acuerdo con la metodología descrita por (Re, y otros, 1999) con ligeras modificaciones. Brevemente, se disolvió ABTS (7

mM) en persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas para producir ABTS⁺. La solución de ABTS⁺ se diluyó con solución salina de fosfato (PBS) (50 mM, pH 8) para obtener una absorbancia de 70 ± 0.02 a 734 nm. Se mezcló 10 μ L de muestra con 990 μ L de solución ABTS⁺ y tras 6 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech Inc., EEUU). Se utilizó PBS como control negativo y ácido ascórbico como control positivo. La actividad se calculó en porcentaje de inhibición.

La actividad antioxidante se expresó en porcentaje de inhibición y se calculó como sigue:

$$\%Inhibición = \frac{Abs(Control\ negativo) - Abs(muestra)}{Abs(Control\ negativo)} * 100 \quad (1)$$

Donde, *Abs(Control negativo)*: Absorbancia del control negativo
Abs(muestra): Absorbancia de la muestra

2.2.4. Inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV)

Se obtuvo el sobrenadante de los hidrolizados después de centrifugar en micro-centrifuga Microfuge 22R a 10000 rpm, durante 10 min. a -6 °C.

El ensayo de inhibición de DPP-IV se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por (Tulipano, y otros, 2011) con ligeras modificaciones. Se realizó en placa multipocillo midiendo la fluorescencia debido a la liberación de 7-amido-4-metilcumarina (AMC) mediante la acción de DPP-IV a partir del sustrato fluorescente interrumpido por Gly-Pro-7-amido-4-metilcumarina (Gly-Pro-AMC).

El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y se procedió de la siguiente manera: 50 μ L de cada muestra se adicionó 50 μ de enzima DPP-IV (diluida en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8 a 4.55 mU/mL). La reacción se inició mediante la adición de 200 μ L de tampón de reacción 0.25 mM (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y Gly-Pro-AMC 20 mM). Una vez adicionado el tampón de reacción, la mezcla se incubó durante 20 minutos a 37 °C.

La generación de fluorescencia se midió en fluorómetro de microplaca Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, MA, EEUU) usando longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente. La inhibición de DPP-IV se expresa en porcentaje de inhibición. Como inhibidor de referencia se empleó Diprotin A (Ile-Pro-Ile) y como control negativo se empleó Tris-HCl 50 mM (pH 8). La actividad de inhibición se calculó y expresó en porcentaje de inhibición, así:

$$\%Inhibición = \frac{Abs(Control\ negativo) - Abs(muestra)}{Abs(Control\ negativo)} * 100 \quad (2)$$

Donde, *Abs(Control negativo)*: Absorbancia del control negativo y
Abs(muestra): Absorbancia de la muestra

2.3. Perfil peptídico de los hidrolizados por HPLC en fase reversa

Se tomó una alícuota de 100 μL del sobrenadante obtenido después de centrifugar en microcentrifuga Microfuge 22R (10000 rpm, 10 min. a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$), se añadió 300 μL de etanol al 96% y se dejó en reposo a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. De nuevo se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante. Luego, se eliminó el etanol presente en las muestras mediante el uso de un evaporador rotatorio, seguido de congelación de las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilización y dilución en 100 μL de agua bidestilada.

Se utilizó un equipo de HPLC de la serie 1100 (Agilent Technologies) con detector de diodos y una columna Symmetry PrepTM C18 (250x4.6 mm, 5 μm) de Waters (Milford, MA). Se utilizaron dos solventes distintos:

- Fase A, contiene 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua bidestilada.
- Fase B, contiene acetonitrilo / agua bidestilada, con una proporción 60:40 (v/v) y un 0,085% de ácido trifluoroacético.

Las fases móviles fueron filtradas y desgasificadas a través de un filtro de 0.45 μm . Se inyectaron 20 μL de extracto peptídico y la separación se realizó con las siguientes condiciones de trabajo: 100% de Fase A durante 2 minutos, seguido de un gradiente lineal de 0% a 50% de Fase B en 50 minutos, a un flujo de 1 mL/min. Se midió la absorbancia a la salida de la columna a 214, 254 y 280 nm.

2.4. Identificación de las secuencias peptídicas mediante LC-MS/MS

Una vez determinada la actividad antioxidante e inhibidora de DPP-IV de los diferentes hidrolizados obtenidos, se tomaron aquellos que presentaron una mayor actividad para la identificación de los péptidos por espectrometría de masas. El análisis se realizó en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia (SCSIE), mediante una cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un sistema de 1D Plus Ultra Eksigent Nano-LC (Eksigent de AB Sciex, CA) con un detector cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) TripleTOF[®] 5600 de AB Sciex Instrumentos (Framingham, MA) que está equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray.

Las fracciones de hidrolizado se resuspendieron en agua con 0.1% de TFA y se inyectaron 5 μL del sobrenadante. Después de 5 minutos de preconcentración, la columna de la trampa se activa automáticamente en línea en una columna capilar nano-HPLC (3 μm , 75 μm x 12.3 cm, C18) (Nikkyo Technos Co, Ltd. Japón). Utilizando las siguientes fases móviles:

Fase A: contenía 0.1% v/v de ácido fórmico en agua.

Fase B: contenía 0.1% v/v FA en 100% de acetonitrilo. Se ha de linear el gradiente de 5% a 35% de disolvente B durante 90 minutos, y 10 minutos de 35% a 65%, a un caudal de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ y la temperatura de funcionamiento a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se utilizó un procesamiento espectral automatizado, generando una lista de picos y permitiendo una búsqueda en base de datos para la identificación

de los péptidos, la cual se realizó mediante el software Mascot Distiller v2.4.2.0 (Matrix Science, Inc., Boston, MA) (<http://www.matrixscience.com>).

2.4.1. Análisis de datos

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando XLSTAT 2011 v5.01 (Addinsoft, Barcelona, España). Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para los ensayos de actividad antioxidante e inhibición de DPP-IV. Se utilizó la prueba de rango múltiple de Fisher para determinar diferencias significativas entre los valores medios con un valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estrategia experimental *in silico*

Tras la búsqueda y recopilación de las principales herramientas existentes para el estudio de péptidos bioactivos *in silico* se observó que las principales bases de datos de proteínas alimentarias que incluían su secuencia completa son NCBI y UniProt, tal y como se indica en la **TABLA 1**. El resto de bases de datos basan su información en éstas dos.

Desde la obtención de la secuencia de la proteína objeto de estudio hasta la simulación de su hidrólisis con el fin de predecir los péptidos liberados, se estudiaron las posibles herramientas informáticas disponibles para la evaluación de la bioactividad de estos péptidos teóricos.

Por lo tanto, se recopilaron distintas herramientas bioinformáticas diseñadas para la realización de simulaciones de digestiones con enzimas específicas (**TABLA 2**). Algunas de estas herramientas permiten digestiones múltiples, lo cual las hace más útiles para hacer determinadas simulaciones.

Finalmente, la **TABLA 3** ilustra las herramientas *in silico* actualmente disponibles para la evaluación de la capacidad bioactiva de las secuencias teóricas obtenidas tras la simulación de la hidrólisis. Algunas corresponden a software comercial.

En este estudio, las bases de datos UniProt y NCBI, permitieron obtener la secuencia de las principales proteínas del suero de la leche (α -La, β -Lg, ABS); las secuencias fueron sometidas a una hidrólisis enzimática *in silico* con diferentes enzimas mediante el uso de herramientas bioinformáticas, como BIOPEP y PeptideCutter de ExPASy.

TABLA 1. Bases de datos de secuencias de proteínas.

NOMBRE	Efectuado por	Link (Web site)
Universal Protein Resource (UniProt)	SIB, EMBL-EBI, PIR.	http://www.uniprot.org/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	NLM, NIH, DHHS, USA Government.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/
Bioactive Peptide (BIOPEP)	University of Warmia and Mazuria in Olsztyn	http://www.uwm.edu.pl/biocemia/

TABLA 2. Herramientas bioinformáticas aplicadas en digestión enzimática *in silico*.

NOMBRE	Suministro	Digestión	Digestión múltiple	Link (Web site)
Bioactive Peptide (BIOPEP)	University of Warmia and Mazuria in Olsztyn	Enzimática	Si	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/
Protein Cutter	Palacky University	Enzimática y química	No	http://biochemie.upol.cz/software/proteincutter/ http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm
Protein Prospector	University of California	Enzimática y química	No	http://web.expasy.org/peptide_cutter/
PeptideCutter	SIB	Enzimática y química	Si	

TABLA 3. Herramientas bioinformáticas para la evaluación de bioactividad.

Software	Funcionalidad
Peptide Ranker (http://bioware.ucd.ie):	Determina la probabilidad que un péptido presente actividad antimicrobiana. Para ello se ingresa la secuencia de los péptidos en el cuadro de texto, los cuales son clasificados según el algoritmo que se asemeje a un péptido bioactivo. El resultado corresponde a la probabilidad de que el péptido sea bioactivo y no al grado de bioactividad.
Peptide Locator (http://bioware.ucd.ie):	Identifica péptidos bioactivos dentro de una secuencia de proteínas. Para ello se ingresa el ID de UniProt de la proteína, y a continuación la herramienta genera la puntuación para cada residuo en la secuencia de la proteína. Esta puntuación representa la probabilidad de que cada residuo es parte de un péptido bioactivo. Su poder predictivo aplica para péptidos antimicrobianos, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas peptídicas, toxinas y venenos.
BIOPEP (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep):	Consta de una base de datos de secuencias (proteínas, péptidos bioactivos, proteínas con epítomos alergénicos) y herramientas para la evaluación de proteínas precursoras de péptidos bioactivos. Se estima un valor para la proteína como precursora de péptidos bioactivo, basado en: frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos en la proteína y el potencial de la actividad biológica de la proteína.
ACEpepDB (http://www.cftri.com/pepdb/index.php):	Base de datos de péptidos antihipertensivos derivados de los alimentos. Esta base de datos permite realizar búsquedas según la fuente del alimento, con la cual arrojará información con base en estudios previos, como: preparación de la muestra para la digestión (enzimática o fermentativa, temperatura, tiempo), método de purificación y secuencias de péptidos obtenidos. Además, permite realizar búsqueda de método de ensayo.

TABLA 3 (continuación). Herramientas bioinformáticas para la evaluación de bioactividad

Software	Funcionalidad
ACCP (http://acpp.bicpu.edu.in/):	Anti Cancer Peptide Predictor es una herramienta basada en Vector Machine para predecir si el péptido dado es un péptido anti cáncer o no. Para lo cual tiene en cuenta: exploración de proteínas con predicción del dominio apoptótico, modo de péptido múltiple, y modo de mutación de péptidos para la predicción y el diseño de péptidos anticancerígenos.
Diseño de Experimentos Multifactorial (DOE) – Metodología de Superficie de Respuesta (RSM):	Adecuado para optimizar la generación de hidrolizados bioactivos mediante la utilización de DOE seguido por la predicción de los parámetros óptimos de hidrolisis con RSM (Nongonierma, y otros, 2017). Las curvas RSM se generan dentro de los límites del DOE con un modelo de regresión multilíneal. DOE permite reducir el número de experimentos requeridos al tiempo que proporciona la capacidad de estudiar efectos interactivos entre los parámetros involucrados en el diseño del experimento.
AutoDock Vina	Consiste en un software de simulación de modelado molecular; basado en un acoplamiento molecular (<i>docking</i>) que pretende predecir la posición, orientación y conformación más probable para la unión a la diana. Sin embargo, está limitado porque solo puede aplicarse a inhibidores competitivos de DPP-IV. De manera que esta herramienta puede ser útil en primera instancia en un tratamiento preliminar de los datos para diferenciar entre péptidos inhibitorios competitivos y no competitivos.
LigPlot	Este programa genera automáticamente diagramas esquemáticos de interacciones proteína-ligando en 2D. Cuando dos o más complejos ligando-proteína son suficientemente similares, LigPlot puede mostrar automáticamente sus diagramas de interacción superpuestos, las interacciones son representadas mediante trazos y/o arcos. Las interacciones son mediadas por enlaces de hidrógeno y por contactos hidrófobos (EMBL-EBI, 2012).
Análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR):	Entre los programas del modelado molecular y cálculos teóricos de propiedades moleculares, se encuentra el análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR). Consiste en una expresión matemática que ayuda en la predicción de bioactividad, relacionando actividades biológicas de la(s) molécula(s) con alguna de sus características químicas y/o geométricas e identifica de forma específica estas secuencias mediante LC-MS (Nongonierma & FitzGerald, 2017).

Al hidrolizar tanto α -La cómo β -Lg con termolisina se obtuvo que se liberaban péptidos con potencial actividad antioxidante e inhibición de la enzima DPP-IV, pero finalmente se seleccionó la α -La debido a su estabilidad en condiciones de elevadas temperaturas.

En la **TABLA 4** se representa la estructura primaria de la α -La mediante la disposición consecutiva de letras sin espacios ni signos intermedios, disponiendo a la izquierda el aminoácido N-terminal y a la derecha el aminoácido C-terminal.

TABLA 4. Secuencia de aminoácidos de la proteína seleccionada: α -La.

MMSFVSLLLVGILFHATQAEQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHTSG
YDTQAI VQNNDSTEYGLFQINNKIWCKDDQNP HSSNICNISC DKFLDDD LTTDDIM
CVKKILDKVGINYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL

En la **TABLA 5** se puede observar las diferentes secuencias de los péptidos y aminoácidos liberados tras la hidrólisis *in silico* de la α -La con termolisina, como también sus puntos de corte.

TABLA 5. Secuencia de α -La con potenciales puntos de corte por acción enzimática de la termolisina.

M – MS – F – VS – L – L – L – VG – I – L – FH – ATQ – AEQ – LTKCE – V – FRE
– LKD – LKGYGG – VS – LPEW – VCTT – FHTSGYDTQ – A – I – VQNNDSTEY G
– L – FQ – INNK – IWCKDDQNP HSSN – ICN – ISCDK – F – LDDD – LTDD – I –
MC – VKK – I – LDK – VG – I NYW – L – AHK – A – LCSEK – LDQW – LCEK – L

La línea (-) representa los potenciales puntos de corte en la secuencia de la proteína. Obtenido por simulación de la proteólisis con termolisina utilizando el software BIOPEP y PeptideCutter de ExPASy.

Una vez conocidas las posibles secuencias a obtener tras la digestión *in silico*, éstas fueron comparadas con los péptidos que han sido previamente identificados y almacenados en la base de datos BIOPEP, a la vez que calcula los valores relacionados con el potencial de actividad biológica de la proteína y frecuencia relativa de liberación de los péptidos bioactivos con la enzima seleccionada, ayudando a predecir la utilidad de la proteína y enzima seleccionadas (**TABLA 6**) (Uniprot: the universal protein knowledgebase, 2017); (NCBI Resource Coordinators, 2016); (Minkiewicz, y otros, 2008); (Gasteiger, y otros, 2003).

TABLA 6. Bioactividad de los péptidos obtenidos por hidrólisis de α -La con termolisina

Actividad	A	B	A _E	W
Inhibidor ACE	0.4225	0.0204	0.0205	0.0534
Antioxidante	0.0634	1.2862	0.0088	0.1104
Inhibidor DPP IV	0.6761	0.0005	0.0342	0.0537
Hipotensivo	0.0070	0.0003		
Agonista opioide	0.0070	2.3474		

Valores calculados por BIOPEP.

A: Frecuencia de aparición de un péptido bioactivo en la proteína; B: Potencial de actividad biológica de la proteína; A_E: Frecuencia de liberación de fragmentos con actividad dada por la enzima seleccionada; W: Frecuencia relativa de liberación de fragmentos con actividad dada por la enzima seleccionada

Conforme a lo anterior, considerando la frecuencia de aparición de péptidos inhibidores de la enzima DPP-IV presentes en la secuencia de la

proteína, su potencial de actividad antioxidante y la frecuencia relativa de liberación de secuencias inhibitoras de DPP-IV y actividad antioxidante generados por la hidrólisis de la α -La con la enzima termolisina, se consideró ésta proteína como una candidata adecuada para la obtención de péptidos con actividad antioxidante e inhibidores de la enzima DPP-IV.

3.2. Ensayo *in vitro*

Uno de los objetivos del estudio fue determinar si la hidrólisis enzimática de la α -La con termolisina da lugar a hidrolizados que presentan actividad antioxidante e inhibitora de DPP-IV de acuerdo con el análisis *in silico* previo. Se obtuvo siete hidrolizados diferentes (0 min., 15 min., 30 min., 1 hora, 2 horas, 3 horas y 24 horas) y se determinó la actividad antioxidante e inhibitora de DPP-IV para cada hidrolizado. En general, todos los hidrolizados obtenidos presentaron tanto actividad antioxidante como inhibición de DPP-IV (**FIGURA 2**). Los valores máximos de actividad se reflejan en la **TABLA 7**.

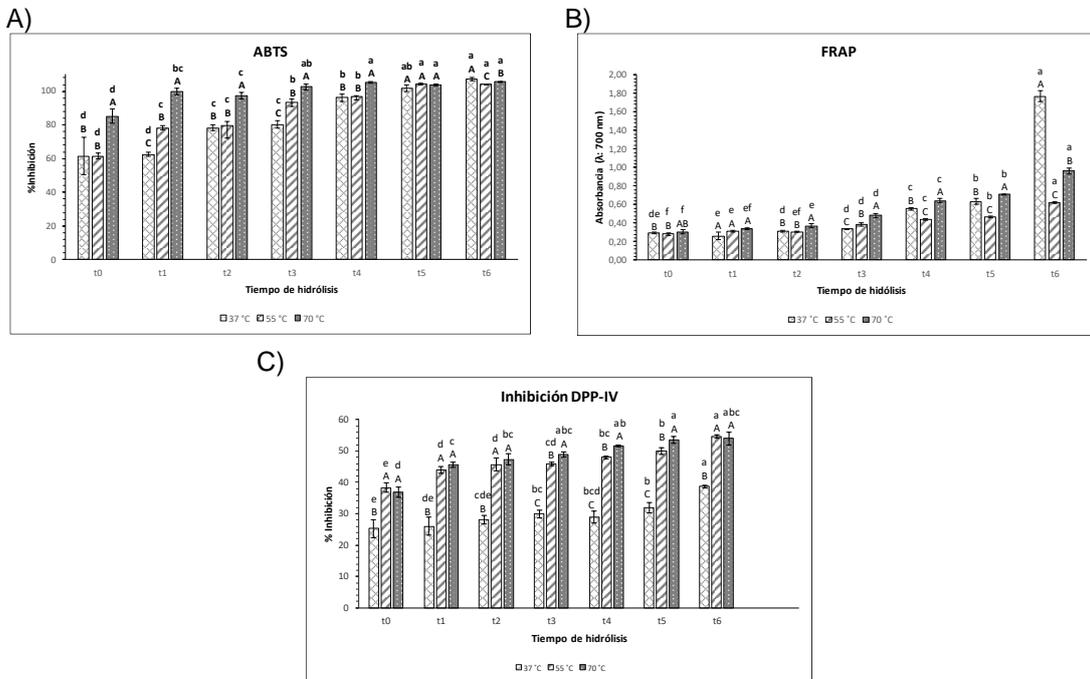


FIGURA 2. Confirmación *in vitro* de actividad antioxidante e inhibición de DPP-IV. t₀: 0 min., t₁: 15 min., t₂: 30 min., t₃: 1 hora, t₄: 2 horas, t₅: 3 horas y t₆: 24 horas, a 37 °C, 55 °C y 70 °C. A) Ensayo de decoloración con el radical catión ABTS⁺; B) Ensayo FRAP; C) Ensayo de inhibición de DPP-IV. Los valores representan la media de las tres repeticiones y las barras representan desviación estándar. Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre los tiempos de hidrólisis a una misma temperatura, mientras que las letras en mayúscula indican diferencias significativas entre temperaturas a un mismo tiempo de hidrólisis, $p < 0,05$.

De acuerdo con N'Negue, y otros (2006), cuando la hidrólisis se realiza a 70 °C, la estructura de la α -La se despliega dejando los enlaces peptídicos más expuestos al ataque enzimático, generando un mayor número de péptidos; mientras que a temperaturas menores de 40 °C se requiere un mayor tiempo de reacción. Esto se manifiesta en los resultados obtenidos al

comparar la actividad antioxidante, tanto por el método ABTS como FRAP (**FIGURA 2A** y **FIGURA 2B**); los hidrolizados obtenidos a 70 °C demostraron actividad antioxidante superior desde el tiempo t_0 hasta el tiempo t_5 ; mientras que el experimento realizado a 37 °C necesitó mayor tiempo de reacción enzimática (t_6) para alcanzar la mayor actividad antioxidante entre todos los hidrolizados.

TABLA 7. Actividad antioxidante

Experimento	ABTS*	FRAP**	DPP-IV*
37 ° C (CaCl ₂)	57.90±1.00	0.161±0.007	37.98±0.94
37 °C	107.37±1.00	1.767±0.009	38.62±0.13
55 °C	104.18±0.32	0.6177±0.013	54.69±1.97
70 °C	105.52±0.24	0.9623±0.001	53.93±0.03

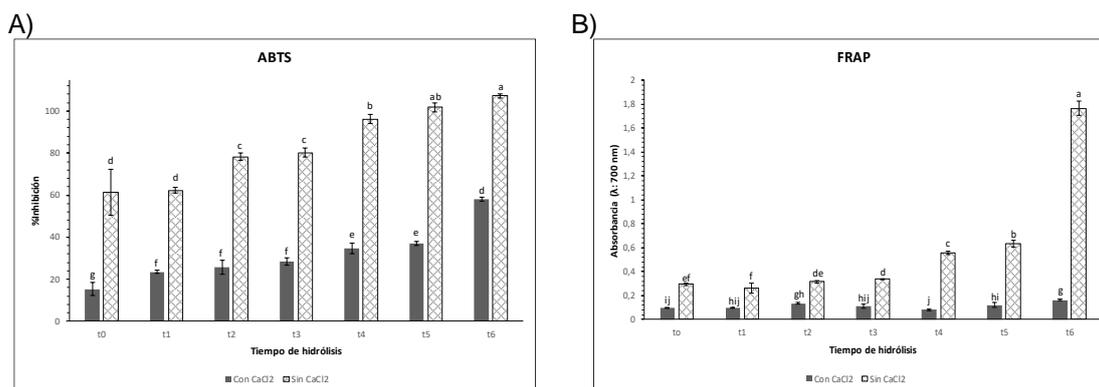
*Expresado en %Inhibición

**Valores de absorbancia

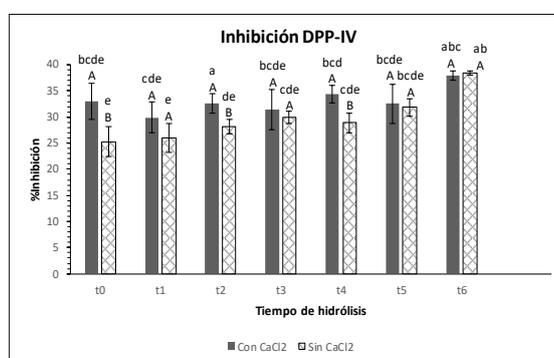
Con respecto a los resultados obtenidos de inhibición de DPP-IV (**FIGURA 2C**), la mayor actividad se observó en los hidrolizados tratados a 55 °C y 70 °C. Se comparó la actividad entre los hidrolizados obtenidos 55 °C y 70 °C durante los primeros 30 minutos (t_0 , t_1 y t_2) y se encontró que los resultados no presentaron diferencia estadísticamente significativa; tras 1 hora de reacción enzimática, la actividad aumentó para los hidrolizados obtenidos a 70 °C hasta el tiempo t_5 , pero en el tiempo t_6 se obtuvo la mayor actividad de inhibición de DPP-IV en los hidrolizados obtenidos a 55 y 70 °C sin diferencia estadísticamente significativa.

Un estudio realizado por Sadat, y otros (2011), reveló que la α -La hidrolizada con termolisina a 70 °C, es una buena fuente de péptidos antioxidantes naturales, identificando los péptidos NYW y LDQW; se llegó a la conclusión que la elección de las condiciones experimentales (temperatura y tiempo) tienen gran importancia en la producción de péptidos, pues el péptido NYW tendió a desaparecer durante la reacción.

Por otro lado, la liberación de péptidos con actividad antioxidante se vio limitada por la presencia de iones de calcio procedentes del CaCl₂ adicionado a la solución tampón (**FIGURA 3A** y **FIGURA 3B**). N´Negue, y otros (2006), compararon hidrolizados de α -La con termolisina a 70 °C en presencia y ausencia de CaCl₂ y encontraron mediante el espectro UV-cercano que la proteína había perdido significativamente su estructura terciaria en ausencia de CaCl₂; esto parece confirmar que la presencia de calcio pudo brindar estabilidad molecular a la estructura de la proteína interfiriendo en el desplegamiento de esta y en consecuencia provocando una disminución en el ataque enzimático.



Por el contrario, los resultados obtenidos para el ensayo realizado de inhibición de DPP-IV representados en la **FIGURA 4** reflejaron que la presencia de CaCl₂ en la solución tampón no influye en la actividad, pues se encontró que en los tiempos t₁, t₃, t₅ y, especialmente t₆, tiempo en el cual se obtuvo la mayor actividad de inhibición para el tratamiento a 37 °C, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.



3.3. Perfil peptídico e identificación de péptidos

Tanto el perfil peptídico como la identificación de las secuencias responsables de la actividad antioxidante e inhibición de DPP-IV de la proteína se llevó a cabo seleccionando las fracciones peptídicas que tenían mayor

actividad, que como se ha descrito anteriormente corresponden a los hidrolizados obtenidos en el tiempo t_6 a 37 °C y a 55 °C, para actividad antioxidante e inhibición de DPP-IV, respectivamente.

En la **FIGURA 5** se ilustra los perfiles peptídicos obtenidos a tiempo t_0 y t_6 para cada tratamiento térmico. Los picos de mayor intensidad encontrados en la **FIGURA 5A** y **FIGURA 5C** corresponden a la proteína intacta en el tiempo t_0 , la cual a medida que avanza la reacción enzimática su intensidad disminuye, como se puede observar en la **FIGURA 5B** y **FIGURA 5D**.

Se compararon los perfiles obtenidos a tiempo t_6 y se observaron mínimas diferencias en términos de ocurrencia. En cambio, las intensidades de los picos sí difieren entre los tratamientos térmicos lo que podría estar relacionado con la actividad enzimática, siendo mayor en el hidrolizado a 55 °C.

Las secuencias de los hidrolizados a 37 °C y 55 °C a tiempo t_6 fueron obtenidos mediante espectrometría de masas. En el hidrolizado a 37 °C se identificaron siete secuencias con longitud entre 9 y 26 aminoácidos, mientras en el hidrolizado a 55 °C se identificaron cuatro secuencias con longitud entre 7 y 11 aminoácidos, tal y como se puede ver en la **TABLA 8**.

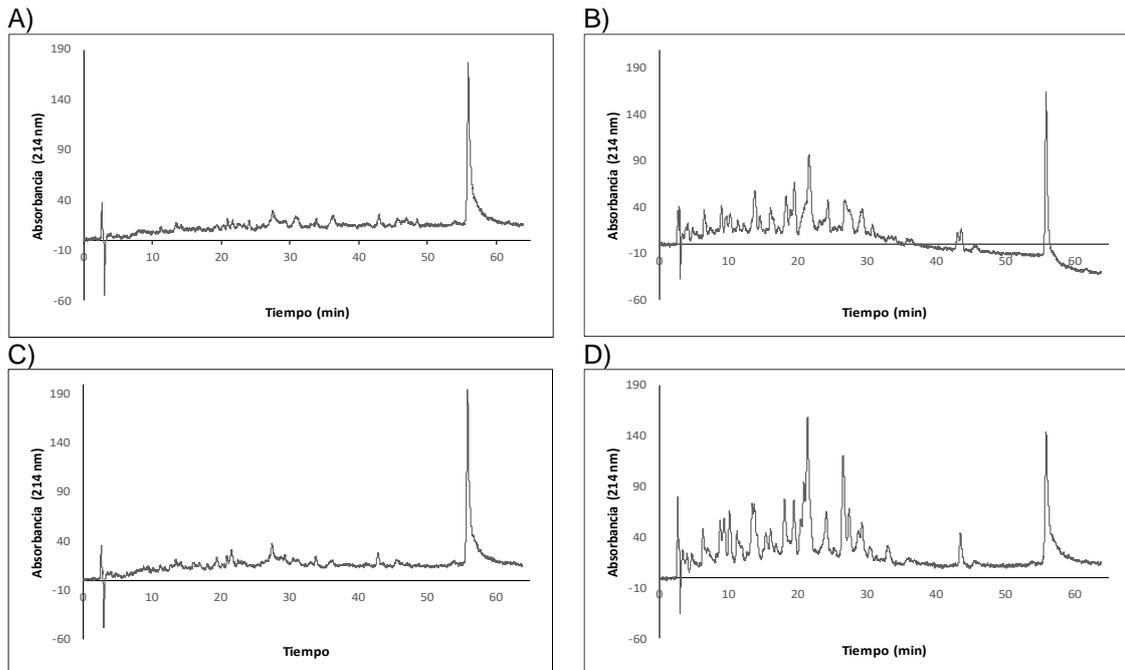


FIGURA 5. Perfiles peptídicos de la hidrólisis de Lactoalbúmina con termolisina A) 37 °C y cero (0) minutos; B) 37 °C y 24 horas; C) 55 °C y cero (0) minutos, y D) 55 °C y 24 horas.

TABLA 8. Secuencias de péptidos generados de α -La hidrolizada con termolisina

37 °C	55 °C
IVQNNDSTEYG	IVQNNDSTEYG
IWCKDDQNPHSSN	IWCKDDQNPHS
ICNISCDKF	IVQNNDSTE
AHKALCSEK	VSLPEWV
LCSEKLDQWLCEK	
DSTEYGLFQINNKIWCKDDQNPHSSN	
LFQINNKIWCKDDQNPHSSN	

Se realizó una comparación entre las secuencias obtenidas a cada tratamiento térmico, se encontró una secuencia en común (IVQNNNSTEYG) y secuencias generadas a 37 °C que no fueron obtenidas a 55 °C, y viceversa. Cabe señalar que de acuerdo con los potenciales puntos de corte de la α -La con la enzima termolisina obtenidos mediante el análisis *in silico*, las secuencias identificadas en el hidrolizado a 37 °C podrían ser parte de productos intermedios de la reacción enzimática, pues aún disponen de potenciales puntos de corte con esta enzima.

Además de estas secuencias, se identificaron secuencias provenientes de otras proteínas lácteas, entre ellas β -Lactoglobulina y albúmina de suero bovino, las cuales poseen secuencias más largas en comparación con α -La.

Como se mencionó, BIOPEP permitió analizar el perfil de la actividad biológica potencial para cada proteína, y al mismo tiempo generó un informe con las secuencias de péptidos con actividad biológica de la proteína de estudio identificadas en otros estudios. Usualmente, las secuencias con actividad biológica se encuentran con una longitud entre 2 y 20 aminoácidos.

Con esta información a disposición, se procedió a buscar en las secuencias obtenidas de los hidrolizados la presencia de péptidos que hubiesen sido identificados y clasificados como inhibidores de DPP-IV y con actividad antioxidante. Encontrando en ambos hidrolizados que a partir de la β -Lactoglobulina presente en la proteína hidrolizada con termolisina se liberó la secuencia LKPTPEGDLEIL considerada inhibidora de DPP-IV por la base de datos BIOPEP. También, se identificaron a partir de α -Lactoalbúmina las secuencias WCKDDQNPHS, LCSEKLDQWL, CKDDQNPHSS, LKPTPEGDL, LKPTPEGDLEIL y TPEVDDEALEK, pero unidos a una o más unidades de aminoácidos en sus extremos.

En relación con la actividad antioxidante, las secuencias AHK y PHS fueron localizadas en los extremos de péptidos obtenidos en los hidrolizados a 37 y 55 °C, respectivamente.

Es importante mencionar que el método de espectrometría de masas empleado en el presente estudio no permite identificar péptidos con secuencias menores de 5 aminoácidos, lo que puede llevar a subestimar la identificación de péptidos pequeños con actividad biológica.

4. CONCLUSIONES

El análisis *in silico* previo sugirió que tanto la α -La como β -Lg bovina eran una buena fuente de péptidos con actividad antioxidante e inhibidores de DPP-IV tras ser sometidas a una hidrólisis enzimática con termolisina, lo cual se confirmó mediante ensayos *in vitro*. Así pues, se confirma que el uso de herramientas *in silico* son útiles en la predicción de proteínas precursoras de péptidos bioactivos, aunque es cierto que se requiere de una optimización de las condiciones de hidrólisis como el tiempo y la temperatura a fin de obtener los péptidos.

La confirmación de actividad *in vitro* es fundamental en la evaluación de proteínas precursoras de péptidos bioactivos, ya que las herramientas bioinformáticas han sido diseñadas para predecir puntos de corte en una proteína de estructura primaria (generalmente, las proteínas de los alimentos

suelen tener estructura secundaria, terciaria, cuaternaria como la α -La) y asumen que todos los enlaces peptídicos que pueden ser cortados son accesibles por la enzima y que pueden ser fácilmente hidrolizados.

A diferencia de los enfoques empíricos que suelen implicar un gasto significativo tanto en términos económicos como en tiempo, la bioinformática proporciona una estrategia rentable al reducir pasos en el flujo de trabajo tradicional.

REFERENCIAS

Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol Adv* 29(3), 272–277. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.001.

Carrasco-Castilla, J., Hernández-Alvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. *Food Engineering Reviews*, 4, 224-243.

Cheung, I. W., Nakayama, S., Hsu, M. N., Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9234-9242.

EMBL-EBI. (13 de julio de 2012). *EMBL-EBI*. Recuperado el 31 de marzo de 2017, de <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R., & Bairoch, A. (2003).

ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mouro, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk proteins. *Food Research International*, 63, 71-80.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I., & Amigo, L. (2006). Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*, 1116, 31-37. Roche

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

Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91, 965-980.

N'Negue, M., Miclo, L., Girardet, J., Campagna, S., Mollé, D., & Gaillard, J. (2006). Proteolysis of bovine α -lactalbumin by thermolysin during thermal denaturation. *International Dairy Journal*, 16, 1157-1167.

NCBI Resource Coordinators. (2016). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 44. Database issue (2016), D7–D19. PMC. Web.

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 1-17.

Nongonierma, A., & FitzGerald, R. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 26-43.

Panchaud, A., Affolter, M., & Kussmann, M. (2012). Mass spectrometry for nutritional peptidomics: how to analyze food bioactives and their health effects. *J Proteomics* 75, 3546–3559. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.022.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9), 1231–1237.
- Roche, R., & Voordouw, G. (1978). The structural and functional roles of metal ions in thermolysin. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 5, 1-23.
- Rodríguez, G., Rentería, A., Rodríguez, J., & Chávez, A. (2014). Biopéptidos en la leche y sus derivados: Funcionamiento y Beneficios a la salud. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 281-294.
- Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M., Gaillard, J., Girardet, J., & Miclo, L. (2011). Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21, 214-221.
- Sánchez, L., Martínez, D., Cruz, E., Miralles, B., Recio, I. (2014). Peptidomics for Discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170-181.
- Tulipano, G., Faggi, L., Nardone, A., Cocchi, D., & Caroli, A. (2015). Characterisation of the potential of B-Lactoglobulin and α -Lactalbumin of sources of bioactive peptides affecting incretin function: In silico and in vitro comparative studies. *International Dairy Journal*, 66-72.
- Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A. M., & Cocchi, D. (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, 32 (4), 835-838.
- UniProt: the universal protein knowledgebase. (2017). *Nucleic Acids Research* 45 (D1), D158-D169
- Vermeirssen, V., van der Bent, A., Van Camp, J., van Amerongen, A., & Verstraete, W. (2004). A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, 231-239.