



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE DIPÉPTIDOS EN EL JAMÓN CURADO Y SU CONTRIBUCIÓN AL SABOR Y ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA:
Rocío Pérez Cano

TUTOR ACADÉMICO:
Prof. Fidel Toldrá Vilardell

TUTORAS EXPERIMENTALES:
Dra. M.^a Concepción Aristoy Albert
Dra. Leticia Mora Soler
Dra. Marta Gallego Ibáñez

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, Julio de 2019

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE DIPÉPTIDOS EN EL JAMÓN CURADO Y SU CONTRIBUCIÓN AL SABOR Y ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

Rocío Pérez, Leticia Mora¹, M-Concepción Aristoy¹, Marta Gallego¹ y Fidel Toldrá¹

RESUMEN

La alta actividad proteolítica ocurrida en el jamón curado durante el periodo de producción es la responsable de la liberación de péptidos de diversos tamaños y aminoácidos capaces de aportar unas propiedades sensoriales características. Una de las enzimas implicadas en este proceso es la dipeptidil peptidasa 4 o DPP 4 cuya actividad proteolítica genera una serie de dipéptidos determinados. La DPP 4, además, es la encargada de la degradación de las hormonas incretinas responsables de la liberación de insulina, lo que la convierte en una enzima de interés para el diseño de tratamientos contra la diabetes tipo 2. En estudios anteriores, se ha demostrado que muchos de los dipéptidos presentes en el jamón curado inhiben a la DPP 4, confiriéndole propiedades antidiabéticas. El principal objetivo de este trabajo consiste en la caracterización de la DPP 4 mediante un estudio de cinética enzimática. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron mediante un método fluorimétrico, es decir, se midió la fluorescencia liberada por la enzima DPP 4 durante la hidrólisis de un sustrato con un grupo fluorescente. La enzima presentó una cinética enzimática que se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten con una constante de Michaelis, K_M de 30,92 μM . También se estudió el efecto inhibitor de los dipéptidos Ala-Ala, Ala-Leu, Pro-Ala y Ala-Pro, como dipéptidos producto generados por la DPP 4 en el jamón curado. Se observó una inhibición por producto de tipo mixta con una constante de disociación para Ala-Pro y Pro-Ala muy similar, siendo sus valores 1,46 y 1,37 mM, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Jamón curado, dipéptidos, DPP 4, actividad antidiabética, inhibidores, cinética enzimática, método fluorimétrico.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)
Avda. Agustín Escardino, 7. 46980, Paterna (Valencia). Telf. 963900022 Ext. 2111

RESUM

L'alta activitat proteolítica ocorreguda en el pernil curat durant el període de producció és la responsable de l'alliberament de pèptids de diverses grandàries i aminoàcids capaços d'aportar unes propietats sensorials característiques. Una dels enzims implicades en este procés és la dipeptidil peptidasa 4 o DPP 4 l'activitat proteolítica de la qual genera una sèrie de dipèptidos determinats. La DPP 4, a més, és l'encarregada de la degradació de les hormones incretinas responsables de l'alliberament d'insulina, la qual cosa la convertix en un enzim d'interés per al disseny de tractaments contra la diabetis tipus 2. En estudis anteriors, s'ha demostrat que molts dels dipèptidos presents en el pernil curat inhibixen a la DPP 4, conferint-li propietats antidiabètiques. El principal objectiu d'este treball consistix en la caracterització de la DPP 4 per mitjà d'un estudi de cinètica enzimàtica. L'activitat enzimàtica mitjançant un mètode fluorimètric, es va mesurar per mitjà de la fluorescència alliberada per l'enzim DPP 4 durant la hidròlisi d'un substrat amb un grup fluorescent en presència d'Ala-Ala, Ala-Leu, Pro-Ala i Ala-Pro, com dipèptidos producte generats per la DPP 4 en el pernil curat. L'enzim va presentar una cinètica enzimàtica ajustada a l'ecuació de Michaelis-Menten amb una constant de Michaelis, K_M de 30,92 μM i una inhibició per producte de tipus mixta amb una constant de dissociació, K_i per a la Ala-Pro i Pro-Ala de 1,46 i 1,37 mM, respectivament.

ABSTRACT

The proteolytic activity occurred in dry-cured ham during the ripening is responsible for the release of peptides and amino acids that provide sensory properties. Dipeptidyl peptidase IV or DPP IV is one of the enzymes involved in this process whose proteolytic activity gives rise to several dipeptides. Additionally, DPP IV degrades two incretin hormones involved in the release of insulin. Consequently, this enzyme could be used for designing diabetes type 2 treatments. In previous studies, it has been shown that many of these dipeptides inhibit DPP IV acquiring antidiabetic properties. The main purpose of the research was the characterization and enzyme kinetic study of DPP IV. The enzyme activity was determined through a fluorimetric method. A substrate with a fluorescent group is degraded by the enzyme DPP IV increasing the fluorescence measured. The enzyme kinetic followed the equation of Michaelis-Menten with a Michaelis constant, K_M of 30.92 μM . This assay was carried out at different concentrations of Ala-Ala, Ala-Leu, Pro-Ala and Ala-Pro (as products generated by DPP IV in Spanish dry-cured ham). Assuming a mixed product inhibition, the dissociation constant K_i for Ala-Pro and Pro-Ala were 1.46 and 1.37 mM, respectively.

INTRODUCCIÓN

El jamón curado es considerado un producto de alta calidad cuyo sabor y textura son característicos (Toldrá y Nollet, 2013). Estas propiedades distintivas son la consecuencia de una serie de reacciones bioquímicas ocurridas durante su proceso de producción. Dichas reacciones tienen mayoritariamente un origen endógeno debido al escaso número de microorganismos vivos presentes en el jamón (Toldrá et al., 1997).

Son varias las enzimas que permanecen activas durante la etapa post mortem del músculo esquelético y que intervienen en múltiples vías metabólicas. Entre ellas se destacan las enzimas glucolíticas que degradan los hidratos de carbono, las lipasas y fosfolipasas responsables de la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos, las enzimas encargadas de la transformación de nucleótidos y las proteasas responsables de metabolizar las proteínas mediante proteólisis (Toldrá, 2006).

Durante la maduración del jamón, se ha observado una intensa degradación de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares (Toldrá y Nollet, 2013). Entre las enzimas peptidasas responsables de esta actividad proteolítica se encuentran las endopeptidasas y exopeptidasas. Mientras que las primeras generan un gran número de polipéptidos y péptidos mediante proteólisis post mortem, las segundas reducen estos péptidos a fragmentos más pequeños o aminoácidos libres (Toldrá y Flores, 1998, Sentandreu et al., 2002). Dentro de las exopeptidasas, se encuentra un grupo de enzimas conocidas como dipeptidil peptidasas (DPP). Este conjunto abarca cuatro tipos distintos de peptidasas; DPP 1, DPP 2, DPP 3 y DPP 4. Las dipeptidil peptidasas, como su nombre indica, liberan diferentes dipéptidos generados a partir del extremo amino terminal de péptidos de mayor tamaño. De hecho, en estudios anteriores se han descrito estas DPP como la causa principal de la presencia de diversos dipéptidos en el jamón curado (Toldrá et al., 2018).

Los dipéptidos generados, junto con una gran variedad de péptidos de distintos tamaños y aminoácidos, son los responsables de muchas de las cualidades sensoriales del jamón curado (Toldrá et al., 2018). Además de sus propiedades organolépticas, los dipéptidos también poseen cierta actividad bioactiva que se puede traducir en un efecto positivo para la salud de los consumidores. Un ejemplo de esto es la actividad antihipertensiva descrita en péptidos del jamón, con la que la acción de los dipéptidos generados podría contrarrestar el efecto negativo de la sal, contribuyendo positivamente al mantenimiento de la presión sanguínea (Escudero et al., 2013).

Otro aspecto importante de algunos de los dipéptidos encontrados en el jamón consiste en su capacidad para inhibir a la dipeptidil peptidasa 4 o DPP 4 (Gallego et al., 2014); enzima responsable de la degradación de las hormonas incretinas, péptido similar al glucagón tipo 1 o GLP-1 y polipéptido inhibitor gástrico o GIP, encargadas de la liberación de insulina durante la ingesta alimentaria. Esto significa, por tanto, que el consumo de jamón curado

podría tener un efecto positivo para los enfermos de diabetes tipo 2 (Fineman et al., 2012).

La DPP 4 es una serín proteasa que puede encontrarse tanto en la membrana plasmática como en forma soluble en un gran número de células. Esta enzima, libera dipéptidos actuando sobre el extremo N-terminal de polipéptidos X-Ala- y X-Pro-, con una considerable preferencia por este último (Cunningham y O'Connor, 1997; Thoma et al., 2003). La DPP 4 presenta su máxima actividad a un intervalo de pH 7,0-8,0 y a una temperatura de 45°C. No obstante, esta enzima se mantiene activa pese a ser inhibida parcialmente a altas concentraciones de NaCl durante los primeros meses del proceso de fabricación del jamón, contribuyendo al aporte de péptidos mencionados con anterioridad (Sentandreu y Toldrá, 2001). Por otro lado, estudios recientes han determinado que muchos de los dipéptidos generados podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio de la propia enzima (Gallego et al., 2014), actuando como reguladores de la proteólisis mediante el control de la actividad enzimática.

El objetivo principal de este trabajo consiste en el estudio de la cinética enzimática de la enzima DPP 4 y del tipo de inhibición que se produce en presencia de una serie de dipéptidos presentes de forma natural en el jamón curado, mediante la determinación de las constantes cinéticas de Michaelis-Menten o K_M , la velocidad máxima de reacción o $V_{m\acute{a}x}$ y la constante de inhibición o constante de disociación K_i . Además de conocer la concentración de dipéptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la DPP 4 o IC_{50} .

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo, el método utilizado se basa principalmente en la medición de la fluorescencia liberada cuando la enzima DPP 4 hidroliza un sustrato con un grupo fluorescente. La enzima degrada este sustrato liberando el grupo fluorescente al medio de reacción y aumentando así la fluorescencia con el tiempo. Para ello, se utilizó un fluorímetro programado para medir la fluorescencia a distintos tiempos y con incubación a temperatura constante (37°C).

Selección de dipéptidos inhibidores

Se seleccionaron varios dipéptidos procedentes del músculo esquelético de cerdo, en concreto de la cadena ligera de miosina (MLC1 y MLC2), los cuales son mayoritarios y presentaron actividad inhibitoria para la enzima DPP 4 según la base de datos de BIOPEP-UWM (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>). Estos dipéptidos vienen expuestos en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Dipéptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 presentes en el jamón curado. Se indica la masa molecular y marca comercial de los dipéptidos sintético.

Ensayo	Dipéptido		Masa molecular (g/mol)	Marca comercial
1	Ala-Ala	AA	160,2	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
2	Ala-Leu	AL	202,2	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
3	Ala-Pro	AP	186,21	Bachem AG, Bubendorf, Suiza
4	Pro-Ala	PA	186,21	Bachem AG, Bubendorf, Suiza

Reactivos y preparación de soluciones de trabajo

TAMPONES DE REACCIÓN

La enzima DPP 4 tiene una máxima actividad a un intervalo de pH comprendido entre 7,0 y 8,0. De este modo, para la preparación tanto de soluciones de trabajo como de diluciones de dipéptidos y sustrato, se elaboró una disolución acuosa de tampón Tris-HCl (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania) a una concentración 50 mM y se ajustó su pH con HCl 1 N hasta 8,0.

Se preparó un Tampón de Reacción (TR) con una composición de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y DL-Ditiotreitol o DTT (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) 0,5 mM.

SUSTRATO

Como sustrato de la reacción enzimática se usó Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin hydrobromide (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para la preparación de la solución de trabajo de cada ensayo se partió de una solución stock resuspendida en DMSO a una concentración de 20 mM. Ésta fue diluida en TR para conseguir las distintas concentraciones de sustrato ensayadas: 0,25 mM, 0,10 mM, 0,05 mM y 0,025 mM.

DIPÉPTIDO INHIBIDOR

Una vez se seleccionaron los dipéptidos a estudiar, se prepararon una serie de diluciones para cada uno. De este modo, se ensayaron seis

concentraciones distintas de dipéptido: 50, 25, 10, 5, 1 y 0,5 mM. Para la preparación de la disolución 50 mM, se pesó en una báscula de precisión los miligramos previamente calculados necesarios para resuspender en un volumen de 500 microlitros de Tris-HCl pH 8,0 a 50 mM. El resto de las soluciones se prepararon a partir de la disolución anterior y usando Tris-HCl pH 8,0 a 50 mM como tampón de dilución.

Antes de preparar las diluciones mencionadas en el párrafo anterior, se determinó la hidrofobicidad de los dipéptidos con ayuda de la base de datos PepCalc de INNOVAGEN (<https://pepcalc.com>). Los péptidos no solubles en agua fueron resuspendidos previamente en 100-200 μ l de DMSO para, de esta manera, conseguir una óptima solubilidad en Tris-HCl pH 8,0 a 50 mM.

CONTROL POSITIVO

Como control positivo de la reacción se escogió el tripéptido Ile-Pro-Ile (Diprotin A) (Sigma-Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) cuya capacidad inhibidora para la DPP4 ha sido comprobada en estudios anteriores.

En primer lugar, con el objetivo de obtener una curva que relacionase el porcentaje de inhibición con la concentración del control, se ensayaron distintas concentraciones de Diprotin A: 500, 100, 50, 25, 10 y 1 μ M. Para la disolución de 500 μ M, se partió de una solución stock resuspendida en 50 mM de Tris-HCl a 50 mM pH 8,0 a una concentración de 14,6 mM. El resto de las diluciones se prepararon a partir de la anterior, usando el tampón Tris-HCl pH 8,0 a 50 mM como medio de dilución.

Una vez obtenida la representación mencionada en el párrafo anterior, se fijó la disolución de Diprotin A a una concentración de 100 μ M como control positivo de los ensayos con dipéptidos.

ENZIMA

La enzima DPP 4 empleada en todos los ensayos fue Dipeptidyl Peptidase IV from porcine kidney (Sigma-Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

En cada ensayo se preparó una solución de trabajo a partir de una dilución 1/200 de la solución stock (1 U/ml), la cual estaba resuspendida en 250 μ l de Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 μ M y NaN₃ al 0,05%, pH 8,0.

Preparación de placas

Todos los ensayos fueron realizados en placas de fluorescencia de 96 pocillos siguiendo un orden determinado como se muestran en la **Figura 1**.

La composición de cada pocillo de la placa fue la siguiente:

50 μ l muestra + 50 μ l enzima + 200 μ l sustrato

La muestra se refiere tanto la dilución de dipéptido correspondiente, como al control positivo o a tampón Tris-HCl pH 8,0 en el caso del control negativo.

El sustrato fue el último componente de la reacción en ser depositado con una pipeta multivía. De este modo, se procuró que la reacción tuviera lugar al mismo tiempo en todos los pocillos de la placa.

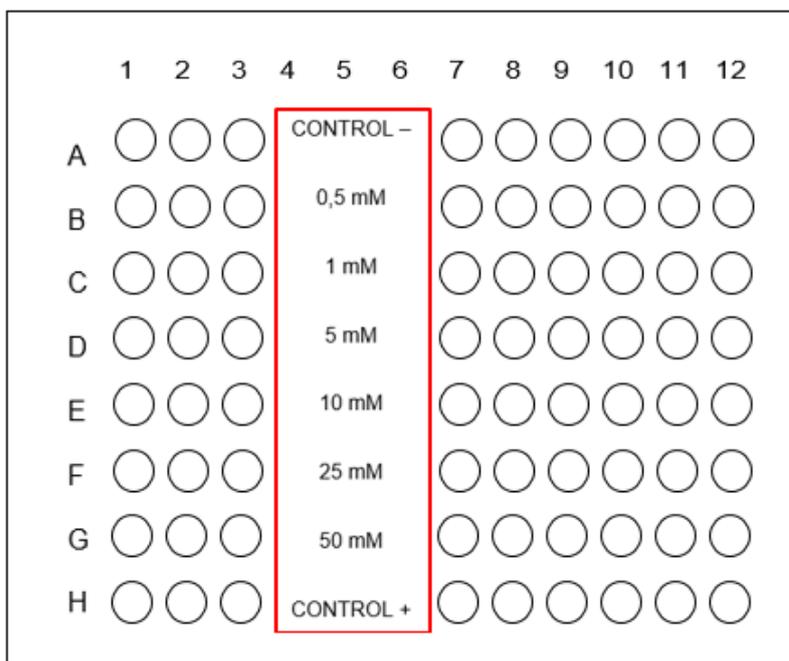


Figura 1. Placa de fluorescencia para ensayo. Cada medida se realizó por triplicado. A1, A2 y A3 fueron utilizados con el control negativo (sin dipéptido inhibidor), H1, H2 y H3 fueron los controles positivos (Diprotin A) y el resto de los pocillos se corresponden a las distintas concentraciones de péptido inhibidor, cada una de ellas ensayada tres veces.

Medida de fluorescencia y toma de datos

La medida de la fluorescencia se realizó mediante un espectrofotómetro con lector de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation LabSystems, Helsinki, Finlandia). Las placas ya preparadas se incubaron a 37°C durante 20 minutos. La lectura de fluorescencia se realizó a tiempo 0 y a los 20 minutos, empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente.

En la **Figura 2.** se muestra un ejemplo del conjunto de datos obtenidos con el equipo Fluoroskan tras analizar uno de los ensayos. Las cifras se corresponden con los valores de fluorescencia UF obtenidos en cada pocillo de la placa.

La fluorescencia se transformó en concentración ($\mu\text{mol/litro}$) usando una recta patrón realizada con el grupo fluorescente aminometil cumarina (AMC).

	A	B	C	D	E	F	G
1							
2	Measurement count: 1 Ex: 355 Em: 460 Scaling Factor : 0.59/0.662						
3		1	2	3	4	5	6
4	A	29,09	31,01	30,17	0,2891	0,2791	0,2743
5	B	29,03	29,11	28,54	0,2823	0,2748	0,2882
6	C	28,34	28,70	28,21	0,2828	0,2773	0,2741
7	D	28,64	29,58	29,83	(1) 0,2718	0,2718	0,2804
8	E	28,27	30,40	29,11	0,2779	0,2700	0,2745
9	F	28,61	30,42	29,06	0,2688	0,2850	0,2735
10	G	28,38	30,41	29,33	0,2720	0,2953	0,2802
11	H	28,20	27,72	28,16	0,3022	0,2715	0,2776
12	Measurement count: 2 Ex: 355 Em: 460 Scaling Factor : 0.59 0.662						
13		1	2	3	4	5	6
14	A	36,90	38,51	37,93	0,2899	0,2693	0,2675
15	B	35,02	34,60	34,79	0,2733	0,2783	0,2818
16	C	32,62	32,46	32,88	0,2816	0,2780	0,2764
17	D	29,96	29,70	30,45	(2) 0,2615	0,2686	0,2679
18	E	28,19	30,24	28,98	0,2900	0,2739	0,2749
19	F	28,05	29,06	29,44	0,2628	0,2819	0,2718
20	G	27,46	28,89	28,59	0,2800	0,2852	0,2832
21	H	27,64	26,99	27,63	0,3049	0,2821	0,2753

Figura 2. Medida de la fluorescencia en distintos pocillos (1) a tiempo inicial t_0 y (2) a los 20 minutos de reacción t_{20} .

Tratamiento de datos y cálculos

COEFICIENTE DE INHIBICIÓN IC_{50}

Para la obtención del IC_{50} , que es la concentración de inhibidor a la que la reacción es inhibida en un 50%, se calculó el porcentaje de inhibición para distintas concentraciones de cada inhibidor mediante la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{F_{control}(t_{20}-t_0) - F_{muestra}(t_{20}-t_0)}{F_{control}(t_{20}-t_0)} \times 100 \quad (1)$$

dónde: $F_{control}(t_{20} - t_0)$ = diferencia de fluorescencia ente t_{20} y t_0 cuando la concentración de dipéptido es 0; $F_{muestra}(t_{20} - t_0)$ = diferencia de fluorescencia entre t_{20} y t_0 a una concentración de dipéptido determinada mayor que 0.

Con ayuda de Microsoft Excel se representaron los porcentajes de inhibición frente a las diferentes concentraciones de dipéptido inhibidor. Representando en el eje de abscisas (x) el logaritmo en base 10 de las siete concentraciones de dipéptido y en el eje de ordenadas (y) el porcentaje de inhibición para cada una de ellas, se seleccionó la parte lineal de la curva logarítmica, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta: $y = mx + b$. Por sustitución se calculó la concentración de inhibidor a la que la reacción es inhibida en un 50% o IC_{50} (Gallego et al., 2014).

Este cálculo se realizó tanto para el control positivo como para todos los dipéptidos ensayados, a una concentración de sustrato 0,25 mM optimizada en estudios previos. De este modo, se garantizó que el sustrato estuviera en exceso y, consecuentemente, se midiese solo la actividad de la enzima inhibida por presencia de inhibidor y no por falta de sustrato.

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA DPP 4

La diferencia de fluorescencia entre t_{20} y t_0 se puede considerar una medida proporcional a la velocidad con la que la enzima degrada el sustrato. De este modo, al aumentar el tiempo, lógicamente aumenta la fluorescencia, es decir, crece la cantidad de grupos AMC liberados al medio de reacción. Esto se traduce, por tanto, en un incremento de la velocidad de reacción. Teniendo esto en cuenta, se obtuvo una medida de velocidad enzimática indirecta mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{UF}{t} = \frac{F_{20} - F_0}{20 \text{ minutos}} \quad (2)$$

dónde: UF/t = Unidades de fluorescencia por unidad de tiempo; F_{20} = Fluorescencia medida a los 20 minutos de reacción; F_0 = Fluorescencia medida al instante 0 de reacción.

La cinética enzimática es definida matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten, la cual viene expresada a continuación:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

dónde: v_0 = velocidad inicial de la enzima; $V_{\text{máx}}$ = velocidad máxima; $[S]$ = concentración de sustrato; K_M = constante cinética de Michaelis-Menten.

Para poder obtener los parámetros cinéticos de la enzima DPP 4, se trabajó con la ecuación anterior linealizada, o lo que es lo mismo, la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (4)$$

dónde: v_0 = velocidad inicial de la enzima; $V_{\text{máx}}$ = velocidad máxima; $[S]$ = concentración de sustrato; K_M = constante cinética de Michaelis-Menten.

De este modo, una vez calculadas las velocidades, se representaron, utilizando Microsoft Excel, los valores inversos de éstas frente a las inversas de las distintas concentraciones de sustrato. Como resultado, se obtuvo una recta como la que aparece en la **Figura 3**. (Robinson, 2015). La recta fue extrapolada para determinar su punto de corte con el eje de abscisas y el eje de ordenadas. Después, se obtuvo su ecuación ($y = mx + b$) y se calcularon los valores de la constante de Michaelis (K_M) y velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$). Se hizo lo mismo para la reacción con cada uno de los dipéptidos a concentraciones determinadas y se obtuvieron los valores de K_M APARENTE y $V_{\text{máx}}$ APARENTE.

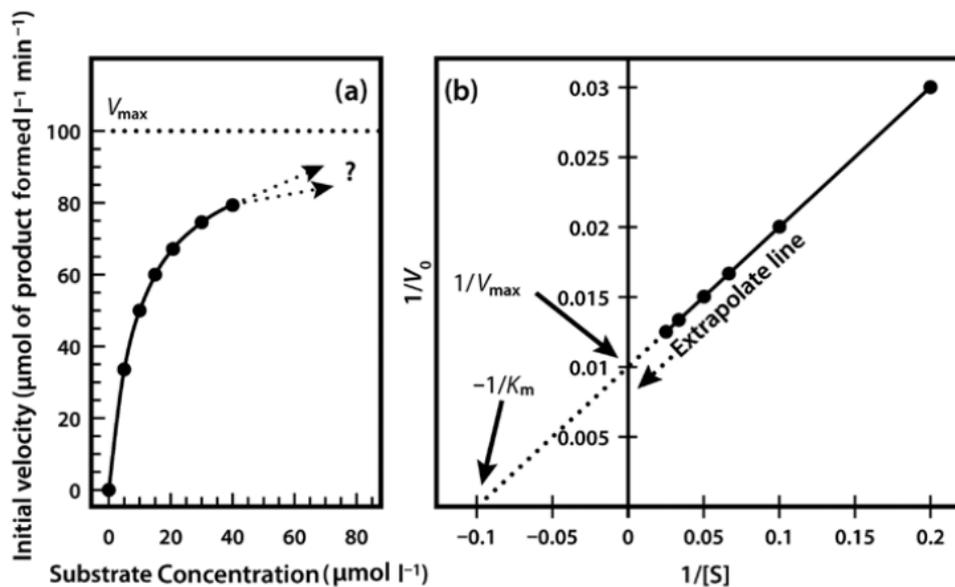


Figura 3. (a) Curva de velocidad enzimática Michaelis-Menten (b) Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk.

La K_M se obtuvo sustituyendo la variable “y” de la ecuación por el valor 0. Se obtuvo así el punto de corte con el eje de abscisas que, según la ecuación de Lineweaver-Burk mencionada con anterioridad, se corresponde con $-1/K_M$. A partir de la pendiente m, que según Lineweaver-Burk equivaldría a $K_M/V_{\text{máx}}$, se obtuvo la velocidad máxima.

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Como se trabajó con diferentes dipéptidos inhibidores de la DPP 4, se seleccionaron para el estudio de la inhibición enzimática únicamente los dipéptidos con un valor de IC₅₀ más bajo, o lo que es lo mismo, con una mayor capacidad inhibidora.

El procedimiento empleado para el análisis del tipo de inhibición que lleva a cabo cada inhibidor fue deducido a partir de la tendencia de las constantes cinéticas K_M y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes al aumentar la concentración de inhibidor. La constante de disociación o inhibición (K_i) se calculó utilizando la fórmula apropiada según la inhibición dada. Como referencia se fijaron cuatro tipos de posibles inhibiciones cuyas características vienen detalladas en la **Tabla 2**. (Cortes et al., 2001).

Tabla 2. Tendencia de los parámetros cinéticos aparentes y cálculo de la constante de disociación K_i para una inhibición competitiva, acompetitiva, no competitiva y mixta.

Tipo de inhibición	Tendencia de parámetros cinéticos al aumentar [Inhibidor]		Cálculo de K_i
	K_M APARENTE	$V_{m\acute{a}x}$ APARENTE	
Competitiva <i>Inhibidor se une a la enzima libre (E)</i>	Aumenta	Constante	$Km_{ap} = Km \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$
Acompetitiva <i>Inhibidor se une al complejo enzima-sustrato (ES)</i>	Disminuye	Disminuye	$Km_{ap} = \frac{Km}{1 + \left(\frac{[I]}{K_i} \right)}$
No competitiva <i>Inhibidor se une con igual afinidad a E y ES</i>	Constante	Disminuye	$\frac{Vm\acute{a}x_{ap}}{Km_{ap}} = \frac{Vm\acute{a}x}{Km} \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{K_i} \right)}$ $Km_{ap} = Km$
*Mixta <i>Inhibidor se une tanto a E como a ES</i>	Aumenta	Disminuye	$\frac{Vm\acute{a}x_{ap}}{Km_{ap}} = \frac{Vm\acute{a}x}{Km} \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{K_{ic}} \right)}$ $Km_{ap} = Km \frac{1 + \left(\frac{[I]}{K_{ic}} \right)}{1 + \left(\frac{[I]}{K_{ii}} \right)}$

*La inhibición mixta presenta dos valores de K_i : K_{ic} y K_{ii} , debido a la capacidad del inhibidor para unirse con distinta afinidad tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato (ES).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética enzimática

La cinética enzimática de la dipeptidil peptidasa 4 fue determinada midiendo las velocidades de reacción a distintas concentraciones de sustrato en ausencia de inhibidor (ver **Figura 4.**). Las unidades de fluorescencia se transformaron a micro moles utilizando la curva patrón correspondiente. Se realizaron diversas repeticiones y se calcularon los valores obtenidos en cada ensayo mediante gráfica de cinética enzimática Lineweaver-Burk, obteniendo los valores promedio de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ de $30,92 \mu M$ y $9,65 \cdot 10^{-6} \mu mol/minuto$, respectivamente.

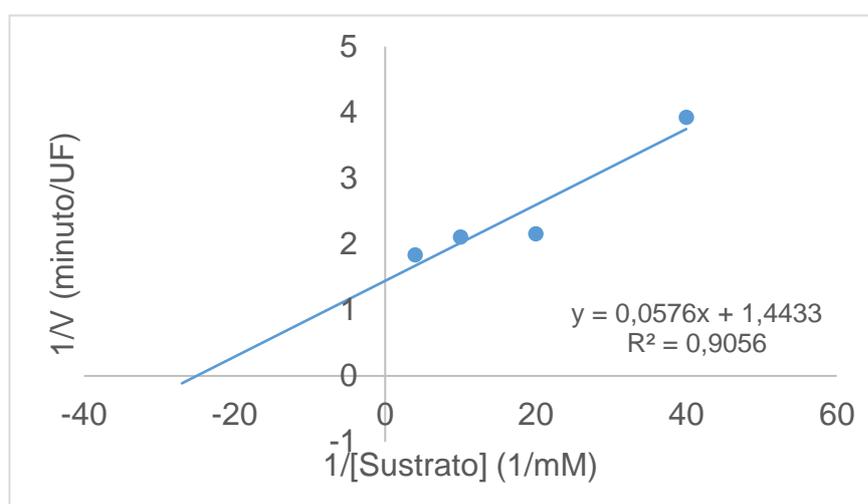


Figura 4. Cinética enzimática de la DPP 4 mediante gráfica de cinética enzimática de Lineweaver-Burk.

Coefficiente de inhibición IC_{50}

Los distintos valores de IC_{50} calculados para los cuatro dipéptidos que se seleccionaron en el apartado anterior se muestran en la **Tabla 3.**

Tabla 3. Valores IC_{50} (mM) para los dipéptidos Ala-Ala, Ala-Leu, Ala-Pro y Pro-Ala.

Dipéptido	IC_{50} (mM)
Ala-Ala	51,88
Ala-Leu	12,56
Ala-Pro	5,43
Pro-Ala	4,05

El dipéptido Ala-Leu, por ejemplo, presentó un IC_{50} de 12,56, o lo que es lo mismo, la concentración necesaria para inhibir a la enzima en un 50% sería de 12,56 mM. Así se ve expresado en el gráfico de la **Figura 5.**, que representa el porcentaje de inhibición de la DPP 4 frente a distintas concentraciones de Ala-Leu. Los IC_{50} para Ala-Pro y Pro-Ala fueron 5,43 y 4,05, respectivamente, lo cual indica una mayor actividad inhibidora de estos dos dipéptidos.

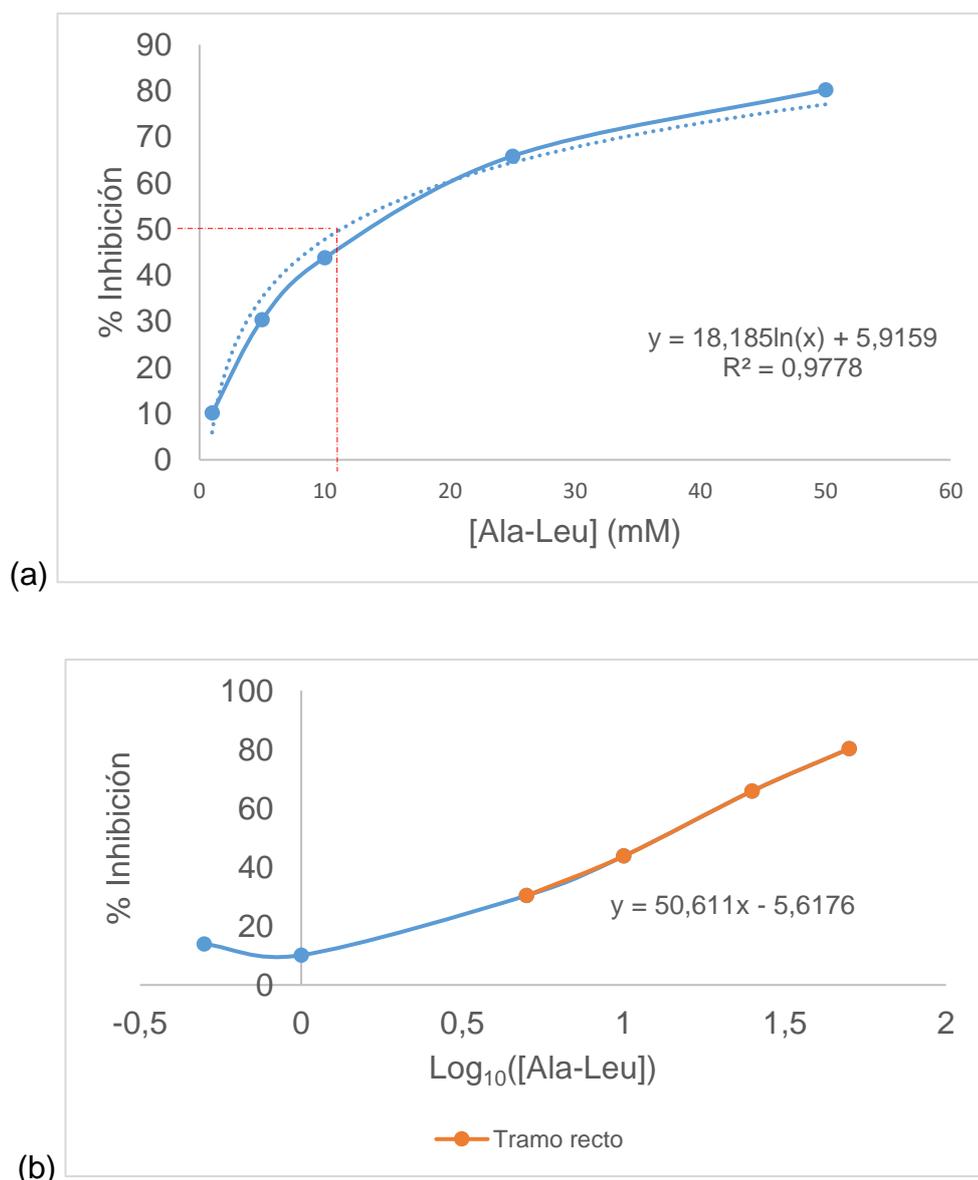


Figura 5. (a) Porcentaje de inhibición de la DPP 4 frente a varias concentraciones de dipéptido inhibidor Ala-Leu. Valor de IC_{50} marcado en rojo. (b) Porcentaje de inhibición frente al logaritmo en base 10 de varias concentraciones de Ala-Leu. Sustituyendo “y” por 50 en la recta “ $y = 50,611x - 5,6176$ ” y despejando el logaritmo del valor de “x”, se obtiene el valor de IC_{50} para este ejemplo.

Cinética de la inhibición

Mediante el cálculo de IC_{50} se determinó que Ala-Pro y Pro-Ala eran los dipéptidos con mayor potencial inhibitorio de los cuatro analizados. Por este motivo, fueron escogidos para determinar las constantes cinéticas de la enzima.

En la **Figura 6.**, se representaron las rectas de cinética enzimática para una concentración de Ala-Pro de 0,5 mM, 5 mM y 10 mM respectivamente, así como la recta de la velocidad para la DPP 4 sin inhibidor. En la **Figura 7.**, se muestran las cinéticas para una concentración de Pro-Ala de 0, 1, 5 y 10 mM. Se observó que cuando los inhibidores estaban a concentraciones más altas (25 y 50 mM) la inhibición de la actividad enzimática crecía ligeramente por encima del 100% debido al error experimental y, por tanto, no fueron considerados.

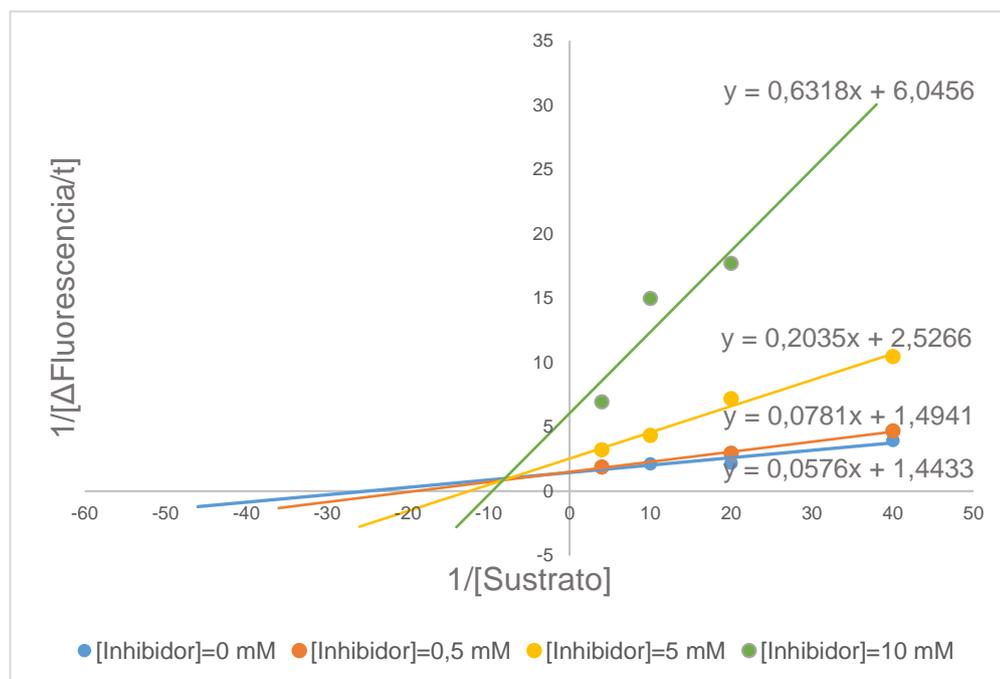


Figura 6. Cinética enzimática de la DPP 4 en presencia de Ala-Pro a 0, 0,5, 5 y 10 mM mediante gráfica de cinética enzimática de Lineweaver-Burk.

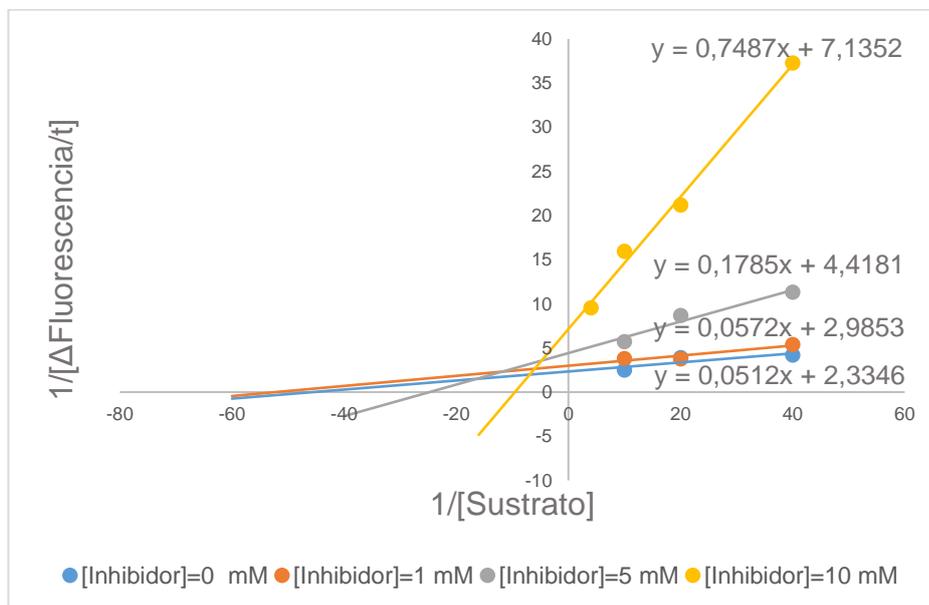


Figura 7. Cinética enzimática de la DPP 4 en presencia de Pro-Ala a 0, 1, 5 y 10 mM mediante gráfica de cinética enzimática de Lineweaver-Burk.

CONSTANTES DE INHIBICIÓN K_i

A partir de las ecuaciones de la recta de las rectas a diferentes concentraciones de inhibidor se obtuvieron las constantes K_M y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes que se recogen en las **Tablas 4 y 5**.

Tabla 4. K_M y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para el cálculo de la constante de inhibición K_i en presencia del dipéptido inhibidor Ala-Pro.

Dipéptido	[I]	K_M aparente (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ aparente ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)	K_i (mM)
AP	0,5	0,05	$11,55 \cdot 10^{-6}$	1,40
	5	0,08	$6,72 \cdot 10^{-6}$	1,97
	10	0,10	$2,76 \cdot 10^{-6}$	1,00
Valor medio				1,46

Tabla 5. K_M y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para el cálculo de la constante de inhibición K_i en presencia del dipéptido inhibidor Pro-Ala.

Dipéptido	[I]	K_M aparente (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ aparente ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)	K_i (mM)
PA	5	0,04	$3,96 \cdot 10^{-6}$	2,01
	10	0,10	$2,41 \cdot 10^{-6}$	0,73
Valor medio				1,37

Tanto para el ensayo con AP como para el ensayo con PA, se observó que la K_M aparente tendía a aumentar, mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ aparente disminuía al ser la concentración de inhibidor mayor. Comparando con los valores reportados en la bibliografía para otros péptidos, que son similares, se concluyó que la inhibición observada consistía en un tipo de inhibición mixta. Mediante sustitución, se calcularon los distintos valores de K_i utilizando las fórmulas adaptadas para una cinética enzimática de inhibición de tipo mixta y se hizo una media para establecer un valor más exacto como constante de inhibición.

Las constantes de inhibición para Ala-Pro y Pro-Ala fueron muy próximas, 1,46 y 1,37 mM, respectivamente. Esto indica que ambos dipéptidos se unen a la enzima con la misma fuerza ejerciendo un efecto inhibitor muy similar.

CONCLUSIONES

Los dipéptidos Ala-Ala, Ala-Leu, Ala-Pro y Pro-Ala inhiben la actividad enzimática de la Dipeptidil Peptidasa 4 con una capacidad de inhibición distinta, siendo 51,88, 12,56, 5,43 y 4,05, respectivamente, sus valores de IC_{50} . Es decir, Ala-Pro y Pro-Ala son los más inhibidores, seguidos de Ala-Leu y Ala-Ala.

La constante de afinidad (K_M) de la enzima por el sustrato Gly-Pro-AMC es de $30,92 \mu\text{M}$ y la velocidad máxima alcanzada por la enzima es de $9,65 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{minuto}$.

Al aumentar la concentración de dipéptido, tanto para Ala-Pro como para Pro-Ala, se produce un aumento en el valor de la K_M aparente y una disminución de la velocidad máxima aparente determinando un tipo de inhibición mixta y por producto, siendo estos dipéptidos productos de la actividad enzimática de la DPP 4. De este modo, Ala-Pro y Pro-Ala se unen tanto a la DPP 4 como al complejo formado por ésta y el sustrato, impidiendo la degradación de este último. Ala-Pro y Pro-Ala también presentan una constante de inhibición (K_i) muy similar, siendo sus valores 1,46 y 1,37 mM, respectivamente.

REFERENCIAS

- Cortes, A., Cascante, M., Cárdenas, M. L., & Cornish-Bowden, A. 2001. Inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Society*, 268, 263–268.
- Cunningham, D. F., & O'Connor, B. 1997. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(2), 160–186.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P. D., Aristoy, M. C., Arihara, K., & Toldrá, F. 2013. Purification and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *Journal of Proteomics*, 78, 499–507.
- Fineman, M. S., Cirincione, B. B., Maggs, D., & Diamant, M. 2012. GLP-1 based therapies: differential effects on fasting and postprandial glucose. *Time*, 1–14.
- Gallego, M., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. 2014. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 96(2), 757–761.
- Robinson, P. K. 2015. Correction : Enzymes : principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, 59(0), 75–75.
- Sentandreu, M., & Toldrá, F. 2001. Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chemistry*, 75(2), 159–168.
- Sentandreu, M. A.; Coulis, G.; Ouali, A. 2002. Role of Muscle Endopeptidase and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 398-419.
- Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., & Henning, M. 2003. Structure basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 11, 947–959.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. 1997. Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59(4), 523–530.
- Toldrá, F., & Nollet, L. M. L. 2013. Preface. In *Proteomics in Foods: Principles and Applications*.
- Toldrá F. 2006. Dry-cured Ham. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Y. H., Hui. Pp 164-1- 164-11. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 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, 331-354.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.C. & Mora, L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.