



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO Y ANTIDIABÉTICO
DE HIDROLIZADOS DE LACTOSUERO PRODUCIDOS
CON ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE PLANTAS**

Por:

Wendy Guadalupe Mora Cortes

TESIS APROBADA POR LA

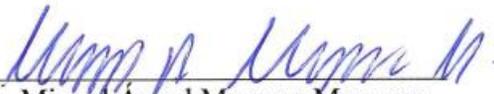
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

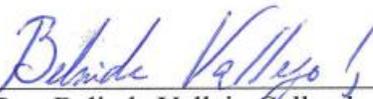
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Wendy Guadalupe Mora Cortes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesora



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Asesor



Dr. Aaron Fernando Gonzalez Córdoba
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



M.C. Jesús Martín Moreno Hernández
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) y a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

A CONACyT por el apoyo otorgado al proyecto No. 248100 “Caracterización de Suero de Queserías Artesanales y su Transformación en componentes de alto valor”, financiado en la convocatoria a Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales PDCPN2014-1, cuyo responsable es el Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano.

A mi asesor el Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano por aceptarme en aquel verano de investigación científica que cambio mi vida, gracias por todo su apoyo, su atención, por la paciencia, por la confianza que deposito en mí y por toda la enseñanza proporcionada.

A mi comité de tesis: Dra. Belinda Vallejo, Dr. Ramón Pacheco, Dr. Aarón González, Dr. Adrián Hernández y M.C. Martin Moreno por todas sus observaciones y consejos para la realización y mejora de este trabajo.

A la Dra. María de Jesús Torres, aunque no formo parte de mi comité de tesis siempre estuvo dispuesta a ayudarme, le agradezco todos sus consejos y la confianza.

Al personal del Laboratorio de Productos Pesqueros la M.C Maria Elena y Julio Cesar y al Laboratorio de Biología Experimental por brindarme todas las facilidades para trabajar en sus laboratorios.

A mis amigos chapingueros Alejandro Epigmenio, Alejandro Santos, Eleazar Aguilar y Rocío Hernández y a la Dra. Priscilia Heredia, gracias por todos los momentos compartidos y por hacer de mi estancia en Hermosillo y en CIAD una bonita experiencia.

A Daniel A. González (mi primer amigo Jalisciense) gracias por todo tu apoyo en el laboratorio para terminar en tiempo y forma este trabajo, gracias por siempre cuestionarme y debatirme ya que eso me obligaba a estudiar.

A Glen Ricardo por enseñarme todos los dichos sonorenses, gracias por los raites cuando el trabajo se alargaba hasta tarde, y por compartir muchas experiencias en mi primer viaje fuera del país.

A Magdalena Leandro y Karen Altamirano por todo el tiempo que compartimos juntas, por compartir momentos inolvidables y por apoyarme cuando estuve enferma.

A mis compañeros de generación, Karla Monjaraz, Brisa del Mar, Alejandro Felician, Ofmara Ponce, Isaac Lopez, Miguel Rendón, Alejandro Epigmenio, Rocío Hernández, Erick Gabriel, David Verdin, Blanca Ocampo, por las experiencias compartidas durante estos dos años y por las conversaciones que nos hacían crecer profesionalmente.

A los técnicos y compañeros del Laboratorio de Productos Lácteos: M.C. Ricardo Reyes y M. C. Carmen Estrada, Talina, Paul, Ilde, Nico, Cinthya, Alejandra, Adilene, Isidro, Lourdes, Carmen, por todas las experiencias vividas y por hacer más ameno el trabajo de laboratorio. A los estudiantes de verano de investigación Hiram Castañón, Hibrain Ramírez, José Teult, por todas las experiencias vividas en tan poco tiempo pero que duraran por mucho tiempo, fue un placer conocerlos.

Al personal de docencia, de la unidad de transferencia e innovación y a Faly Gil, por todas las facilidades otorgadas en la realización de trámites.

A los productores de queso fresco artesanal del Ejido la Victoria, el señor “Don Calay” y a su esposa por todas las facilidades otorgadas para la recolección de muestras y por siempre recibirnos con gusto en su casa.

A mis grandes amigos Daniel Garcia, Josue Perea y Monse Sandoval, porque a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes en las largas pláticas llenas de consejos y motivándome a siempre seguir adelante, gracias por todo el apoyo que me dieron para terminar con esta gran etapa.

DEDICATORIA

A Dios y a mi abuelito Evaristo Cortes que desde el cielo guían mi camino.

A mis padres Rogelio Mora Lomelí y Judith Cortes Moreno por ser mi mejor amiga y por siempre motivarme. Porque ustedes son y serán mi gran motor de vida, porque nunca han dudado de mi capacidad, con mucho cariño les dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento a todos sus sacrificios.

A mis hermanos Rogelio Mora Cortes por ser mi compañía, mi apoyo incondicional y por siempre estar tan orgulloso de mí, eres el mejor ejemplo de perseverancia y constancia. A Sebastián Mora Cortes por llenar con tu alegría cada día de mi vida.

A mis abuelitos Guadalupe Mora, Aurelia Lomelí y Estela Moreno, porque en todo momento han estado velando por mí, porque siempre han creído en mí; especialmente a mi abuelito Guadalupe porque siempre que he necesitado de su ayuda lo hace al doble.

A mi tío Román Mora porque siempre me ha tratado como a otro de sus hijos, sin su apoyo jamás lo hubiese logrado.

A todos ustedes con mucho cariño

¡Por todos ustedes soy lo que soy ahora!

Muere lentamente
quien se transforma en esclavo del hábito,
repetiendo todos los días los mismos trayectos.
No arriesga vestir un color nuevo y no le habla a quien no conoce.
Quien no arriesga lo cierto por lo incierto para ir detrás de un sueño,
quien no se permite por lo menos una vez en la vida,
huir de los consejos sensatos.
Quien abandona un proyecto antes de iniciarlo,
no preguntando de un asunto que desconoce
o no respondiendo cuando le indagan sobre algo que sabe.
Evitemos la muerte en suaves cuotas,
recordando siempre que estar vivo exige un esfuerzo mucho mayor
que el simple hecho de respirar.
Solamente la ardiente paciencia hará que conquistemos
una espléndida felicidad.

Martha Madeiros

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ECUACIONES	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Valor funcional, Nutrimental y Biológico de las Proteínas de Lactosuero.....	19
2.1.1 Propiedades Funcionales de las Proteínas del Lactosuero.....	19
2.1.2 Propiedades Nutrimentales de las Proteínas del Lactosuero.....	20
2.1.3 Propiedades Biológicas de las Proteínas del Lactosuero.....	21
2.2 Péptidos con Actividad Biológica.....	24
2.3 Generación de Péptidos con Actividad Biológica.....	25
2.3.1 Fermentación Microbiana.....	27
2.3.2 Hidrólisis Enzimática	27
2.4 Alimentos Funcionales y sus Efectos Benéficos a la Salud	29
2.5 Diabetes e Hipertensión: Problemas de Salud Pública Mundial.....	30
2.5.1 Panorama Mundial de la Hipertensión Arterial.....	30
2.5.2 Panorama Mundial de la Diabetes Mellitus.....	33
2.6 Procesos Bioquímicos que Regulan la Presión Arterial Sanguínea y la Glucosa Sanguínea.....	35
2.6.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y su Papel sobre la Presión Arterial.....	35
2.6.2 El Efecto Incretina y Acción de la Enzima DPP-IV.....	37
2.7 Hidrolizados Proteicos con Capacidad Inhibitoria de la Enzima DPP-IV y ECA.....	40
2.8 Proteasas Vegetales en la Generación de Péptidos Bioactivos.....	41
3. HIPÓTESIS	45

CONTENIDO (continuación)

	Página
4. OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo General.....	46
4.2 Objetivos Específicos.....	46
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1 Materia Prima.....	47
5.2 Determinación de Características Fisicoquímicas del Lactosuero.....	47
5.3 Preparaciones Enzimáticas.....	48
5.4 Determinación de la Actividad Proteolítica y Concentración de Proteína de los Extractos Enzimáticos.....	48
5.5 Preparación de Hidrolizados de Lactosuero con Diferentes Preparaciones Enzimáticas.....	49
5.5.1 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Pepsina.....	49
5.5.2 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Papaína.....	50
5.5.3 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Extractos Enzimáticos de Melón y Trompillo	51
5.6 Eficiencia de las Proteasas Sobre la Degradación Proteolítica de las Proteínas del Lactosuero.....	51
5.6.1 Análisis del Perfil Hidrolítico por Electroforesis SDS-PAGE.....	51
5.6.2 Determinación del Grado de Hidrólisis.....	52
5.7 Identificación de Fracciones Peptídicas por Cromatografía de Exclusión Molecular.....	53
5.8 Ensayo de Inhibición de Actividad de la Enzima DPP-IV.....	53
5.9 Ensayo de Inhibición de Actividad de la ECA.....	54
5.10 Análisis Estadístico.....	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1 Características Fisicoquímicas del Lactosuero.....	58
6.2 Características de las Preparaciones Enzimáticas.....	60
6.3 Propiedades Fisicoquímicas de los Hidrolizados de Proteínas de Lactosuero. Producidos.....	60
6.4 Perfil de Elución de la Fracción < 3 kDa Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular	65
6.5 Inhibición de las Enzimas DPP-IV y ECA por los Hidrolizados Proteicos y sus Fracciones.....	68
6.6 Correlación entre la Inhibición de las Enzimas DPP-IV y ECA de las Fracciones Peptídicas.....	77
7. CONCLUSIONES	79
8. RECOMENDACIONES	80
9. REFERENCIAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Procesos de obtención de péptidos bioactivos.....	26
2	Principales factores que contribuyen a la hipertensión arterial y a la diabetes y a sus complicaciones.....	31
3	Prevalencia de presión arterial elevada en ambos sexos de 18 años, estimación estandarizada por edad.....	32
4	Distribución de personas entre los 20 y 79 años diagnosticadas con diabetes en el mundo en el año 2017 y su proyección para el 2045.....	34
5	Esquema simplificado del sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	36
6	Esquema de la disminución de glucosa en la sangre por acción de inhibidores de DPP-IV.....	39
7	Perfil típico de proteínas de lactosuero y perfil hidrolítico de los hidrolizados.....	63
8	Perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados de lactosuero con Melón (A) y Trompillo (B).....	66
9	Perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados de lactosuero con Papaína (C) y Pepsina (D).....	67
10	Inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA de los hidrolizados de lactosuero.....	70
11	Inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA de las fracciones <3 kDa de hidrolizados de lactosuero.....	71
12	Inhibición de la enzima DPP-IV de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de hidrolizados proteicos.....	73
13	Inhibición de ECA de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de hidrolizados proteicos.....	74
14	Correlación entre la inhibición de la actividad de la enzima DPP-IV y ECA.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Actividades biológicas y beneficios potenciales para la salud por consumo de proteínas de lactosuero.....	23
2	Uso de enzimas vegetales para la liberación de péptidos bioactivos en diferentes sustratos.....	43
3	Condiciones enzimáticas en las que se liberan péptidos inhibidores de DPP-IV de proteínas de lactosuero.....	44
4	Mezcla de reacciones para ensayo de inhibición de actividad de ECA..	55
5	Composición fisicoquímica del lactosuero dulce (base húmeda).....	59
6	Grado de hidrólisis de los diferentes hidrolizados.....	64
7	Efecto del tipo de enzima y fracción cromatográfica de los diferentes hidrolizados de lactosuero en la inhibición de la actividad de la enzima DPP-IV.....	76

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Determinación del porcentaje del grado de hidrólisis.....	52
2	Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad de DPP-IV.....	54
3	Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad de ECA.....	56

RESUMEN

Algunas proteínas alimentarias, como las del lactosuero, presentan en su secuencia de amino ácidos fragmentos peptídicos con potencial antidiabético y antihipertensivo por su capacidad para inhibir la enzima Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV) y la enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), respectivamente. Se ha reportado que estos péptidos pueden ser liberados de las proteínas del lactosuero con el uso de enzimas de origen animal (e.g., pepsina, tripsina) pero con una limitada eficiencia y que las proteasas provenientes de plantas tienen un potencial para este fin biotecnológico. Por lo tanto, el objetivo del trabajo de investigación es evaluar la eficiencia de extractos enzimáticos de trompillo (*Solanum eleagnifolium*), melón blanco (*Cucumis melo*), y papaína sobre las proteínas de lactosuero para producir péptidos inhibidores de las enzimas DPP-IV y ECA *in vitro*. Se evaluó la capacidad hidrolítica de proteasas vegetales provenientes de trompillo, melón blanco y papaína, y pepsina como referencia, sobre las proteínas del lactosuero, mediante el grado de hidrólisis (% GH) y perfil hidrolítico (SDS-PAGE). Se obtuvieron fracciones <3 kDa y fracciones por cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados producidos, a los cuales se les evaluó el potencial antihipertensivo y antidiabético mediante la capacidad inhibitoria (IC₅₀) de ECA y DPP-IV *in vitro*. Los perfiles hidrolíticos evidencian que las proteasas vegetales presentaron una mayor capacidad hidrolítica sobre la α -Lactoalbúmina y β -Lactoglobulina en comparación con pepsina (control). Por otro lado, el % GH fue mayor ($p < 0.05$) en los hidrolizados con melón (7.8%) y papaína (6.7%) respecto al hidrolizado con pepsina (4.7%), sin embargo, este último no presentó diferencias significativas ($p \geq 0.05$) con el hidrolizado con trompillo (3.9%). Se observó que en todos los hidrolizados, así como en la fracción <3 kDa de los mismos, mayor inhibición de la actividad de la ECA con respecto a la inhibición de la enzima DPP-IV ($p < 0.05$). Por otro lado, la fracción 4 (fracción peptídica de menor tamaño molecular teórico) obtenida por cromatografía de exclusión molecular, presentó la mayor actividad inhibitoria en ambas enzimas, al mostrar los valores de IC₅₀ más bajos de 0.029 y 0.007 mg/mL para DPP-IV y ECA respectivamente. Además, se observó una fuerte asociación ($r = 0.9588$) entre la inhibición de la actividad de ECA y

DPP-IV. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los hidrolizados proteicos de lactosuero producidos con enzimas proteolíticas de plantas, presentan potencial para la producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas del lactosuero y su uso en la formulación de alimentos funcionales con propiedades antihipertensivas y antidiabéticas, que coadyuven al tratamiento de enfermedades de gran impacto en salud pública.

Palabras clave: Proteasas vegetales, *Solanum eleagnifolium*, *Cucumis melo*, Lactosuero, Péptidos bioactivos, Dipeptidil peptidasa -IV, Convertidora de angiotensina.

ABSTRACT

Food proteins such as those from whey, present peptides in their sequence with bioactive properties such as antidiabetic and antihypertensive due to their ability to inhibit enzymes such dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) and angiotensin converting enzyme (ACE), respectively. It has been reported that these peptide fragments have been released using enzymes of animal origin (e.g., pepsin, trypsin) but with limited efficiency and plant proteases offer a great potential of use in this biotechnological process. Therefore, the aim of the research work is evaluate the efficiency of enzymatic extracts of trompillo (*Solanum eleagnifolium*), white melon (*Cucumis melo*), and papain on whey proteins to produce peptides inhibitors of DPP-IV and ECA *in vitro*. The hydrolytic capacity of vegetable proteases from trompillo, melon and papain, as well as pepsin as control, on the whey proteins was evaluated by the degree of hydrolysis (% DH) and hydrolytic profile (SDS-PAGE). Fractions <3 kDa obtained by ultrafiltration and their fractions by gel permeation chromatography (CEM) were evaluated by their antihypertensive and antidiabetic properties by the inhibitory capacity (IC₅₀) of ECA and DPP-IV *in vitro*, respectively. The hydrolytic profiles show that the plant proteases showed a greater hydrolytic capacity on α -Lactoalbumin and β -Lactoglobulin compared to pepsin. The % DH was higher ($p < 0.05$) in hydrolysates obtained with melon (7.8%) and papain (6.7%) compared to the hydrolysate with pepsin (4.7%), however, no significant differences were found ($p \geq 0.05$) between hydrolysates prepared with melon and trompillo (3.9%). All the hydrolysates, as well the <3 kDa fractions, showed greater inhibition of the ECA (lower values IC₅₀) than DPP-IV ($p < 0.05$). In addition, fraction 4 (peptide fraction of smaller theoretical molecular size) obtained by CEM showed the greater inhibitory activity for both enzymes, showing the lower IC₅₀ values of 0.029 and 0.007 mg/mL for DPP-IV and ECA respectively. In addition, a strong association ($r = 0.9588$) between the inhibition of the activity of ECA and DPP-IV was observed. The results obtained in this research show that whey protein hydrolysates produced with plant proteolytic enzymes have potential for their production and use in the formulation of functional foods with antihypertensive and antidiabetic properties, which contribute to the treatment of diseases of great impact on public health.

Keywords: Plant proteases, *Solanum eleagnifolium*, *Cucumis melo*, Whey proteins, Bioactive peptides, Dipeptidyl peptidase -IV, Angiotensin converting enzyme.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diferentes tratamientos para la prevención de la mortalidad excesiva y prematura por diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial, principalmente por complicaciones cardiovasculares (Tahrani et al., 2011). Dentro de estos tratamientos, se encuentran el uso de inhibidores de la enzima Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV) y la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), enzimas de importancia en la regulación de la glucosa en el torrente sanguíneo y de la presión arterial, respectivamente (Juillerat-Jeanneret, 2014). Algunos de estos inhibidores se pueden encontrar de manera natural en diferentes fuentes proteicas, que, al ser hidrolizadas por diferentes métodos, se pueden liberar péptidos biológicamente activos.

Una fuente importante de proteínas con excelentes características funcionales y nutricionales son la leche y sus derivados. En los últimos años el consumo y producción de quesos se ha incrementado y con esto la generación del lactosuero, el cual contiene más del 50% de los sólidos totales de la leche destinada al proceso de quesería, la mayoría de la lactosa, vitaminas, minerales y proteínas séricas que representan aproximadamente el 20% de la proteína de la leche. Las proteínas del lactosuero presentan un alto contenido de aminoácidos esenciales y son consideradas de gran importancia en la nutrición de niños, deportistas y adultos mayores (Mollea et al., 2013). El alto valor tecnológico, biológico y nutricional de las proteínas del lactosuero ha incentivado su aprovechamiento, mediante el uso de nuevas estrategias tecnológicas y biotecnológicas se aumente el valor agregado del lactosuero de las proteínas del lactosuero.

La producción de hidrolizados proteicos a partir de lactosuero representa una alternativa para el aprovechamiento de sus proteínas, mediante el mejoramiento de las propiedades funcionales y bioactivas para la formulación de alimentos funcionales (Ramos et al., 2016). La hidrólisis de las proteínas del lactosuero permite la liberación de secuencias peptídicas con propiedades bioactivas específicas tales como antihipertensivas, antimicrobianas, opioides, antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, entre otras (Hernández-Ledesma et al., 2011). Las enzimas proteolíticas que más se utilizan en la

producción de hidrolizados provienen de origen animal y microbiano, y en un menor grado de fuentes vegetales (Li et al., 2013). Sin embargo, la creciente demanda de proteasas con potencial biotecnológico ha incentivado la búsqueda de nuevas fuentes naturales con gran atención en algunas plantas o frutos con alta concentración de enzimas proteolíticas (Mazorra-Manzano et al., 2017) Las proteasas de fuentes vegetales poseen propiedades catalíticas atractivas, sin embargo, su uso ha sido poco explorado en la producción de péptidos con capacidad de inhibir las enzimas DPP-IV y ECA.

En diversos estudios, para la producción de hidrolizados proteicos, la selección de enzimas proteolíticas y sustratos proteicos se realiza de manera aleatoria sin tomar en cuenta su especificidad, ni la secuencia de péptidos potencialmente bioactivos en el sustrato, respectivamente. Lo anterior deja al azar la bioactividad potencial a evaluar y conlleva a la exploración de diversas propiedades en los hidrolizados (comúnmente antioxidante y antihipertensiva), limitando con esto la eficiencia del proceso hidrolítico.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo de investigación fue evaluar la eficiencia de extractos enzimáticos de trompillo, melón, y papaya sobre las proteínas de lactosuero, para producir péptidos capaces de inhibir *in vitro* las enzimas DPP-IV y ECA. Los resultados obtenidos en el trabajo permitirán el uso de hidrolizados proteicos generados a partir lactosuero y enzimas proteolíticas de origen vegetal en la producción y uso en la formulación de alimentos funcionales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Valor Funcional, Nutricional y Biológico de las Proteínas de Lactosuero

La separación de las proteínas caseicas de la leche mediante su precipitación durante la producción de quesos, genera un líquido amarillo verdoso denominado lactosuero. La precipitación de las caseínas puede ocurrir mediante la acidificación de la leche por el crecimiento microbiano, adición de ácidos orgánicos (láctico, cítrico) o enzimas coagulantes (Kilara y Vaghela, 2018). El lactosuero contiene más del 50% de los sólidos totales de la leche utilizada para la fabricación de queso, en este se encuentra la mayoría de la lactosa, vitaminas y minerales, además de las proteínas séricas que representan aproximadamente el 20% de la proteína de la leche (Mollea et al., 2013). La composición y características del lactosuero varían según el origen de la leche y el método elaboración del queso. Por lo tanto, resulta indispensable explorar sus características tecnológico-funcionales para la generación de co-productos de alto valor para la industria alimentaria y farmacéutica.

Las proteínas del lactosuero, han sido reconocidas por su aporte nutricional y como ingredientes alimentarios. Son proteínas de alta calidad nutricional por los aminoácidos esenciales que aporta a la dieta, además, cada una de las proteínas del lactosuero aportan propiedades tecnológico-funcionales muy interesantes (e.g. capacidad de retención de agua, emulsificantes, gelificantes, etc.); así como sus efectos positivos en la nutrición para deportistas e infantes y como auxiliares en el tratamiento de enfermedades.

2.1.1. Propiedades Funcionales de las Proteínas del Lactosuero

Las propiedades funcionales de las proteínas son el conjunto de atributos fisicoquímicos que otorgan propiedades sensoriales en el producto final (Weder y Belitz, 2003). Las

propiedades funcionales de las proteínas de lactosuero como ingredientes son interesantes y extremadamente versátiles en la tecnología de alimentos (Ramos et al., 2016). Las características más importantes de utilizar el lactosuero como ingrediente alimentario, es que mejoran las características sensoriales de alimentos y bebidas al impartir diferentes propiedades como retención de humedad, alta solubilidad, viscosidad, gelificación, emulsificación y capacidad espumante; en la aplicación de alimentos se ha utilizado al lactosuero para:

- Mejorar la aireación en panadería y confitería
- Mejoras en color y sabor por interacciones entre proteínas y lactosa durante el procesamiento térmico en productos de confitería
- Sustituir el uso de leche en polvo descremada en formulaciones de productos lácteos (e.g. yogurt, helado)
- Desarrollo de fórmulas infantiles con beneficios nutricionales, mediante la adaptación de la formula infantil a la composición de la leche humana.
- Aumento de la biodisponibilidad de sales como Ca y Zn en alimentos para personas de edad avanzada.
- Desarrollo de alimentos dietéticos con alto valor de saciedad, bajo contenido de grasa y alto contenido de proteína

Los ingredientes de suero con bajo contenido de proteínas, se utilizan frecuentemente en la formulación de productos lácteos y panadería, mientras que las proteínas aisladas del lactosuero se utilizan en alimentos para la salud, productos para lactantes y suplementos para deportistas (Ramos et al., 2016).

2.1.2. Propiedades Nutrimentales de las Proteínas del Lactosuero

Las proteínas del lactosuero presentan un alto valor nutritivo debido al amplio perfil nutricional de aminoácidos esenciales. El efecto benéfico se atribuye a su rápida digestión, que se refleja en la rápida absorción de sus aminoácidos después de su ingesta (Mollea et al., 2013). Se ha reportado que las proteínas del lactosuero son más eficaces en la saciedad

en comparación con las caseínas cuando ambas proteínas se estudiaron en términos de ingesta de alimentos. El efecto de saciedad esta atribuido a la acción de a) las proteínas *per se*, b) los péptidos bioactivos, c) aminoácidos liberados en la digestión y d) a la acción combinada de proteínas y/o péptidos y/o aminoácidos (Luhovyy et al., 2007; Madureira et al.,2007).

Por otro lado, las proteínas de lactosuero son ampliamente utilizadas en la nutrición deportiva debido a la alta concentración de aminoácidos de cadena ramificada, los cuales se metabolizan por el musculo y no por el hígado; ya que este tipo de aminoácidos activan enzimas clave implicadas en la síntesis de proteínas en el musculo (Boland, 2011). Además, se ha observado que los aminoácidos de cadena ramificada conducen a la acumulación de proteínas musculares en ancianos (Katsanos et al., 2008)

Las proteínas del lactosuero, al ser proteínas de alta calidad y contener aminoácidos esenciales en proporciones que el cuerpo necesita; además, respecto a la manera eficiente en que el cuerpo humano utiliza las proteínas, estas presentan el valor biológico más alto en comparación con proteínas de huevo, del pescado o carne (Mollea et al., 2013). La composición nutrimental única de las proteínas del lactosuero, ha incentivado su uso para el tratamiento de enfermedades y para el mantenimiento de la salud.

2.1.3. Propiedades Biológicas de las Proteínas del Lactosuero

El lactosuero es considerado una fuente importante de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) los cuales tienen importantes respuestas metabólicas (Stevenson y Allerton, 2018), como el crecimiento y desarrollo de órganos específicos, y la resistencia a diferentes enfermedades (Ramos et al., 2016). Los beneficios potenciales de cada una de las proteínas del lactosuero así como algunos de sus fragmentos, incluyen propiedades antihipertensivas (Bertucci et al., 2015), antimicrobianas (Madureira et al., 2010), opioides (Yadav et al., 2015), antioxidantes (Bertucci et al., 2015), antivirales (Hernández-ledesma et al., 2014), inmunomoduladoras (Patel, 2015) antitrombóticas

(Madureira et al., 2010), anticancerígenas (Boohaker et al., 2015) y antidiabéticas (Mignone, 2015; Lacroix y Li-Chan, 2016;). Las principales actividades biológicas de las proteínas de suero de leche se resumen en la Tabla 1.

Diferentes estudios sugieren que las proteínas del lactosuero disminuyen la glucemia postprandial (glucosa en sangre después de ingerir alimentos) a través de varios mecanismos interrelacionados, incluyendo el aumento en la secreción de insulina, la secreción de hormonas incretinas, la disminución del vaciamiento gástrico y la reducción del apetito (Mignone, 2015); además, se ha reportado el potencial antihipertensivo de péptidos derivados del lactosuero, al mostrar inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (Kilara y Vaghela, 2018). Durante los últimos años, se ha demostrado que después de diferentes procesos hidrolíticos, péptidos derivados de las proteínas mayoritarias del lactosuero (β -lactoglobulina y α -Lactoalbumina) pueden presentar otras actividades biológicas. Se han identificado péptidos antioxidantes, antimicrobianos, hipocolesterolémicos u opioides (Hernández-Ledesma et al., 2008), así como la presencia de péptidos inhibidores de la enzima DPP-IV (Tulipano et al., 2015) y de la ECA (Pihlanto-Leppala et al., 2000).

Tabla 1. Actividades biológicas y beneficios potenciales para la salud por consumo de proteínas de lactosuero.

Proteína	Actividad Biológica
Proteínas del Lactosuero	Prevenición de cáncer (e.g., cáncer de mama e intestinal). Incremento de los niveles de glutatión Aumento de la vulnerabilidad de células tumorales Tratamiento de VIH Actividad antimicrobiana Incremento de la respuesta de saciedad Incremento en aminoácidos plasmáticos, colecistoquinina y péptidos similar al glucagón
β -Lactoglobulina	Transportador de retinol, palmitato, vitamina D, colesterol, ácidos grasos y triglicéridos. Protección durante su paso a través de las condiciones del estómago. Desarrollo y transferencia de inmunidad pasiva Regulación del metabolismo de la glándula mamaria Actividad anticancerígena Actividad inmunomoduladora
α -Lactoalbúmina	Actividad anticancerígena Síntesis de lactosa Tratamiento de enfermedades crónicas inducidas por el estrés
Albumina	Síntesis de lípidos Actividad anti-mutagénica Actividad antioxidante Actividad anticancerígena
Inmunoglobulinas	Actividad inmunomoduladora Protección de enfermedades (inmunidad pasiva) Actividad antibacteriana Actividad antifúngica Actividad opioide Tratamiento de VIH
Lactoferrina	Actividad antimicrobiana Actividad antifúngica Actividad antiviral Actividad antitrombótica Actividad inmunomoduladora Actividad antiproliferativa
Lactoperoxidasa	Actividad antimicrobiana Actividad antifúngica Actividad inmunomoduladora

Fuente: (Madureira et al., 2010; Hernández-Ledesma et al., 2011; Ramos et al., 2016)

2.2. Péptidos con Actividad Biológica

Además del papel nutricional de las proteínas, las propiedades funcionales y bioactivas de las proteínas alimentarias se atribuyen principalmente a su secuencia peptídica, y con el fin de explotar sus efectos sobre la salud para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, se ha estudiado la liberación de péptidos bioactivos, su relación entre estructura y actividad, así como su biodisponibilidad (Hafeez et al., 2014).

Los compuestos bioactivos se definen como “Compuestos bioactivos esenciales y compuestos no esenciales (e.g., vitaminas o poli fenoles) que se encuentran en la naturaleza, son parte de la cadena alimenticia y se puede demostrar que tienen un efecto sobre la salud humana” (Biesalski et al., 2009). Los efectos benéficos de los péptidos son atribuidos a las diferentes propiedades que presentan, como son antimicrobianas (Perez Espitia et al., 2012), antioxidantes (Zheng et al., 2006), antihipertensivas (Hernández-ledesma et al., 2011), antidiabéticas (Iwaniak et al., 2018), inmunomoduladoras (Tavares et al., 2011), entre otras.

Los péptidos bioactivos son reconocidos por su capacidad para inhibir las interacciones proteína-proteína debido a su tamaño y especificidad (Daliri et al., 2017), se ha reportado que el tamaño de las secuencias activas puede variar desde 2 hasta 20 residuos de aminoácidos y muchas de las secuencias pueden presentar múltiples funcionalidades (Korhonen y Pihlanto, 2007). Las proteínas de alimentos de origen vegetal y animal, durante la digestión gastrointestinal, son hidrolizadas en diferentes secuencias peptídicas, algunos de los péptidos liberados comparten características estructurales con péptidos endógenos que cumplen diferentes funciones en el organismo (i.e. hormonas, neurotransmisores o péptidos reguladores), y los péptidos derivados de la dieta (exógenos) interactúan con los mismos receptores en el organismo para ejercer una actividad agonista o antagonista (Hernández-Ledesma et al., 2014).

2.3. Generación de Péptidos con Actividad Biológica

Los péptidos son inactivos en la secuencia primaria de las proteínas y pueden ser liberados por diferentes vías o procesos (Figura 1), como la digestión, fermentación y por la hidrólisis mediante enzimas proteolíticas derivadas de animales, microorganismos o plantas (Korhonen y Pihlanto, 2006). Además, también pueden ser liberados durante el procesamiento de los alimentos (cocción, madurado, etc.) (Daliri et al., 2017). Conjuntamente a la generación de péptidos a partir de fuentes proteicas naturales mediante hidrolizados proteicos también se ha explorado la producción de péptidos específicos mediante técnicas de ADN recombinante (Korhonen y Pihlanto, 2006).

La ultrafiltración (UF) y la nanofiltración se han utilizado para el fraccionamiento de hidrolizados proteicos, debido a que la mayoría de los péptidos bioactivos se encuentran en el rango del tamaño de poro de la mayoría de las membranas y la combinación de procesos de UF permitía obtener soluciones enriquecidas de péptidos bioactivos (Patil et al., 2014). Además, se ha aplicado el uso de UF y cromatografía líquida en hidrolizados de proteicos, observándose que la UF es suficiente para aumentar el contenido de péptidos y posteriormente el permeado tratado por cromatografía de exclusión molecular permite obtener péptidos pequeños para una mejor caracterización de actividad biológica (Kapel et al., 2011)

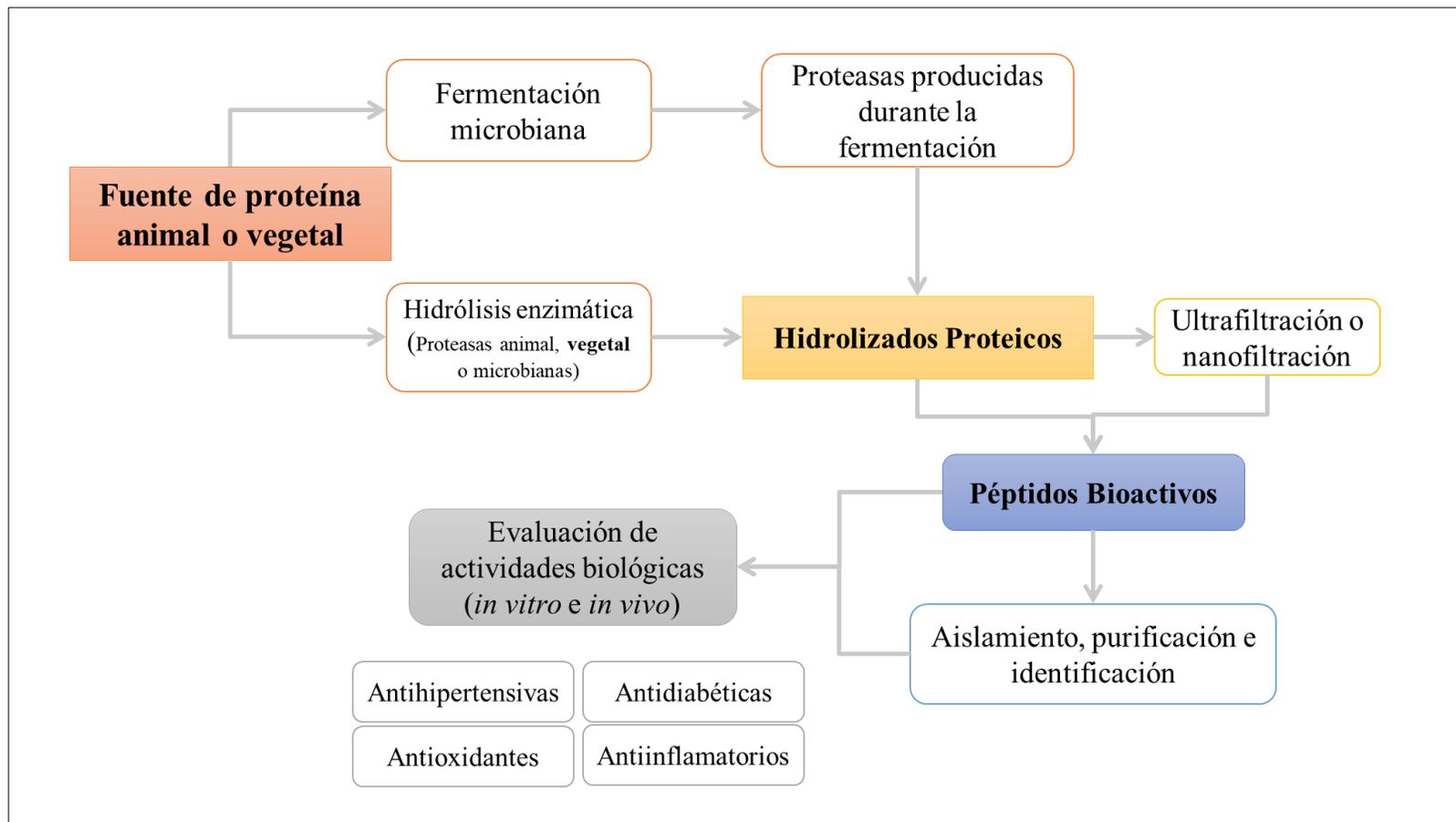


Figura 1. Procesos de obtención de péptidos bioactivos (de Castro & Sato, 2015)

2.3.1 Fermentación Microbiana

La fermentación microbiana se ha utilizado en la preservación de alimentos y en la mejora de las propiedades nutritivas y sensoriales. Lactobacilos y bifidobacterias han sido ampliamente utilizados por ser altamente proteolíticos. El sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, ya han sido caracterizados (Parra-Huertas, 2010). Su sistema proteolítico consiste en proteinasas unidas a la pared celular y varias peptidasas intracelulares distintas, incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas (Korhonen y Pihlanto, 2006). Aunado a la complejidad del sistema proteolítico, la actividad de estas enzimas se vea afectada por las condiciones de crecimiento del microorganismo lo que hace posible manipular la formación de péptidos hasta cierto punto. Por otra parte, se ha observado que, debido a la breve duración del proceso de fermentación de alimentos, y a la especificidad de las enzimas proteolíticas, la liberación de péptidos bioactivos es baja. Además, el grado de proteólisis está en función de las especies y cepas de microorganismos empleadas para la liberación de péptidos bioactivos, así como de las condiciones del proceso de fermentación (Hernández-Ledesma et al., 2011).

2.3.2. Hidrólisis Enzimática

Los hidrolizados proteicos se obtienen por la escisión de enlaces peptídicos de las proteínas sustrato, los cuales se pueden llevar a cabo por procesos enzimáticos o químicos (Neklyudov et al., 2000). La hidrólisis enzimática es una de las técnicas más rápidas y fáciles de controlar para mejorar las propiedades funcionales y la producción de péptidos bioactivos (Korhonen & Pihlanto, 2006), así como también para darle un valor añadido a los subproductos de bajo valor comercial.

Las proteasas o enzimas proteolíticas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos en las proteínas. Las proteasas ocupan poco más del 60% del mercado de enzimas de uso industrial comercializadas a nivel mundial (Moral et al., 2015), con un valor en el mercado que se acercó a los 5 mil millones de dólares anuales en 2013 y una proyección de ventas globales de 7.1 mil millones para 2018 (Garske et al., 2017). Las proteasas, están íntimamente relacionadas con vías biológicas vitales de diferentes organismos y algunas de estas han sido recuperadas para aprovecharse en procesos biotecnológicos (Tavano, 2013). Enzimas gastrointestinales como pepsina, tripsina, quimotripsina y enzimas de origen microbiano como termolisina y alcalasa han sido ampliamente utilizadas para la liberación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de la leche y otras fuentes (Hafeez et al., 2014).

La hidrólisis enzimática de las proteínas depende de la especificidad de la enzima, proteína y grado de desnaturalización de la proteína sustrato, concentración de la enzima, pH, temperatura, fuerza iónica y la presencia o ausencia de inhibidores, siendo la especificidad de la enzima el factor clave que afecta la cantidad y la propiedad funcional de los péptidos (Kilara y Vaghela, 2018). Este tipo de hidrólisis, conduce a una disminución en el peso molecular de la proteína, un aumento en los grupos ionizables, y la exposición de grupos hidrofóbicos hasta ahora ocultos, por lo tanto, el cambio en las propiedades funcionales es un resultado directo de estos cambios (Daliri et al., 2017). Después de la hidrólisis enzimática los péptidos pueden recuperarse por liofilización, desalinización, ultrafiltración con membrana o cromatografía de exclusión molecular, esta última se puede usar para desalar rápidamente péptidos de bajo peso molecular y separarlos en función de sus tamaños (Zhang et al., 2016).

Por otro lado, el uso de subproductos obtenidos de diferentes fuentes de proteínas, como rastros o mataderos, industrias pesqueras, suero de queso (lactosuero), en condiciones enzimáticas controladas es una alternativa atractiva para la generación de péptidos con actividad biológica (Toldrá et al., 2018).

2.4. Alimentos Funcionales y sus Efectos Benéficos a la Salud

En la actualidad, la idea de los consumidores sobre la relación entre dieta y salud, ha incentivado el desarrollo y consumo de alimentos que ejerzan un efecto positivo en la salud cuando están presentes en la dieta. Siendo esta característica la base fundamental para la definición de Alimento Funcional. Ashwell (2002) define un alimento funcional como “aquel alimento que se demuestra satisfactoriamente que afecta a una o más funciones corporales específicas, más allá de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y el bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas”. Un alimento funcional puede ser un alimento natural no modificado; un alimento en el que uno de sus componentes se ha mejorado a través de condiciones especiales de cultivo o reproducción; un alimento en el cual alguno de sus componentes ha sido modificado por medios enzimáticos, químicos o tecnológicos para proporcionar algún efecto benéfico; un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de un componente; o una combinación de cualquiera de los anteriores (Pravst, 2012). Dentro de los ingredientes principales en la elaboración de alimentos funcionales, se han considerado a los péptidos bioactivos.

La alimentación equilibrada y óptima influye en todos los procesos metabólicos y fisiológicos; tal es el caso de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la hipertensión que se relacionan con los cambios en la ingesta energética total, el grado de actividad física y una alimentación poco equilibrada. Se ha considerado el uso de los alimentos funcionales en el tratamiento de las enfermedades crónicas, ya que pueden ser efectivos y con un menor riesgo de efectos adversos en comparación con los tratamientos farmacológicos (Brown et al., 2015).

2.5. Diabetes e Hipertensión: Problemas de Salud Pública Mundial

Actualmente, un gran número de adultos mexicanos están en riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial, en función de su peso corporal (Rojas-Martínez et al., 2012). Los graves problemas de salud pública, son resultado de la asociación de la prevalencia de la hipertensión arterial con la obesidad abdominal, diabetes e hipercolesterolemia. Además, las personas que no son diagnosticadas con hipertensión pero que poseen factores de riesgo metabólico, están predispuestos a desarrollar enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión (Román-Vargas et al., 2016).

2.5.1 Panorama Mundial de la Hipertensión Arterial

La hipertensión es un padecimiento multifactorial que puede dañar órganos vitales ya que es una afección en la cual la presión en los vasos sanguíneos es continuamente alta, por lo que está considerada como un problema de salud pública. La tensión arterial normal en un adulto se define como una tensión sistólica de 120 mm Hg (que se produce cuando el corazón se contrae) y una tensión diastólica de 80 mm Hg (se produce cuando el corazón se relaja entre un latido y otro) (OMS, 2013). La prevalencia de la hipertensión se les atribuye a diferentes factores, como la urbanización y el envejecimiento, además, a factores de riesgo relacionados con el comportamiento, como una dieta inadecuada, el consumo excesivo de alcohol, inactividad física y sobrepeso (Figura 2) (OMS, 2013).

En 2008, en el mundo se habían diagnosticado con hipertensión el 40% de los adultos mayores de 25 años (OMS, 2013). En el 2015, la máxima prevalencia de hipertensión se registra en la Región de África, con más del 30% de los adultos mayores, mientras que la prevalencia más baja (<20%) se observa en América (Figura 3) (OMS, 2015). En México, la prevalencia de hipertensión arterial fue de 25.5% y solo el 58.7% de los adultos con diagnóstico previo se encuentran con un control adecuado (ENSANUT MC, 2016).

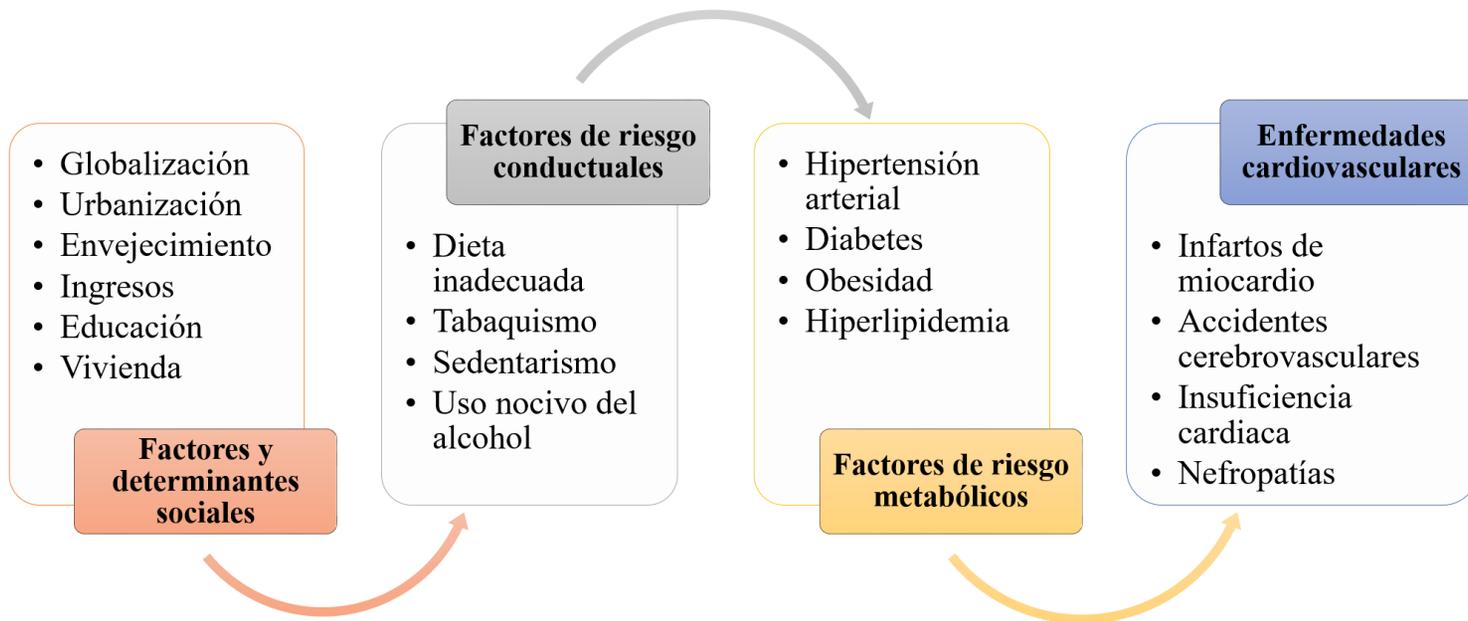


Figura 2. Principales factores que contribuyen a la hipertensión arterial y a la diabetes, así como, sus complicaciones (OMS, 2013).

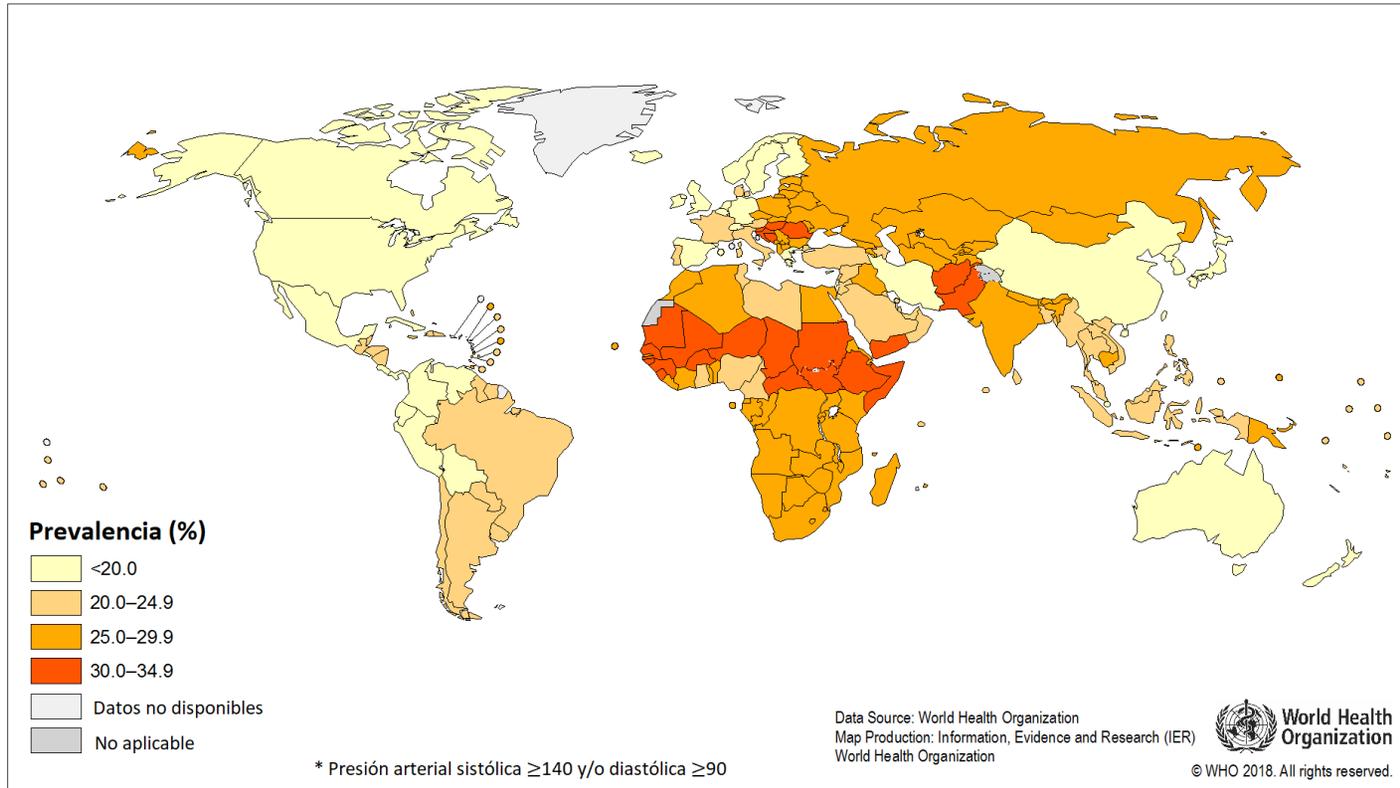


Figura 3. Prevalencia de presión arterial elevada en ambos sexos de 18 años, estimación estandarizada por edad (OMS, 2018).

2.5.2 Panorama Mundial de la Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico causado por un desorden glandular que se manifiesta en alteraciones en la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo. La diabetes a nivel mundial, es considerada una de las enfermedades de mayor crecimiento. Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en 2017 fueron diagnosticadas con diabetes mellitus 425 millones de personas en el mundo y se espera que esta cifra aumente a 629 millones de personas para el año 2045. La distribución de personas entre los 20 y 79 años diagnosticadas con diabetes en el mundo en el año 2017 y su proyección para el 2045 se presenta en la Figura 4 (IDF, 2017). En México la diabetes es considerada la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2016).

La diabetes se puede clasificar en tres diferentes tipos: Diabetes mellitus gestacional, tipo 1 y tipo 2. La DM es un desorden metabólico multifactorial, crónico y debilitante, caracterizado por la deficiencia del cuerpo para producir insulina (diabetes mellitus tipo 1; DM1) o por defectos en la producción y acción de la insulina (diabetes mellitus tipo 2; DM2) (Lacroix y Li-chan, 2014). La insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas, su función principal es contrarrestar la hiperglucemia (niveles altos de glucosa en sangre), la falta o insuficiencia de insulina en personas con DM ocasiona que la glucosa continúe circulando en la sangre. La hiperglucemia causa daños en muchos tejidos del cuerpo, originando el desarrollo de complicaciones en la salud del enfermo que pueden ser incapacitantes y poner en peligro su vida (MBP, 2017). Se ha reportado que el riesgo de sufrir complicaciones micro y macro vasculares, está estrechamente relacionado al control de la glucosa en el torrente sanguíneo (Mignone, 2015). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), los criterios que clínicamente establecen que un individuo padece diabetes incluyen:

- Concentración de glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL.
- Concentración de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL, 2 horas después de haber consumido una solución con 75 g de glucosa

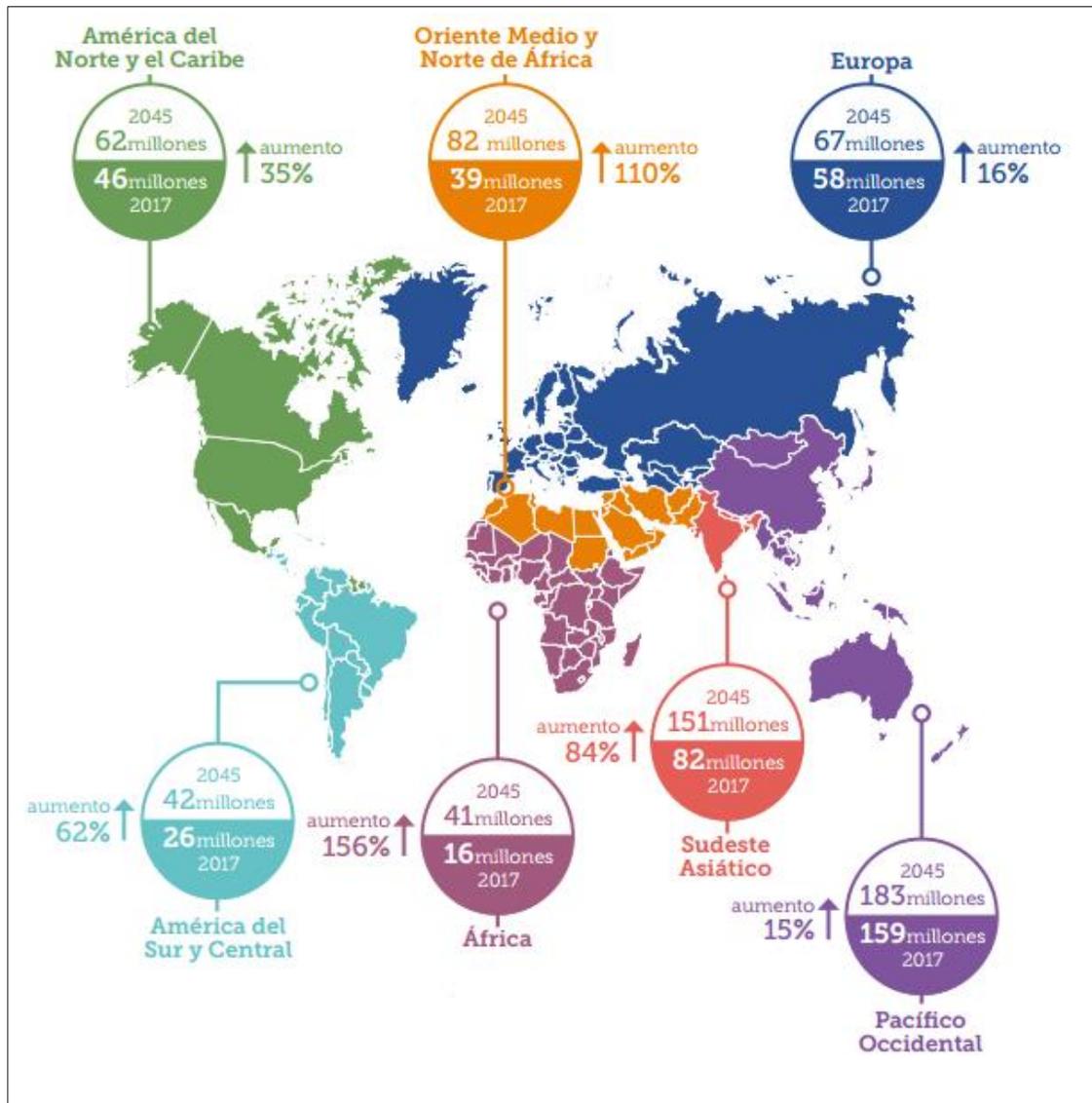


Figura 4. Distribución de personas entre los 20 y 79 años diagnosticadas con diabetes en el mundo en el año 2017 y su proyección para el 2045 (FID, 2017).

2.6. Procesos Bioquímicos que Regulan la Presión Arterial Sanguínea y la Glucosa Sanguínea.

2.6.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y su Papel sobre la Presión Arterial.

Dentro de los sistemas de regulación de la presión arterial sanguínea, se encuentra el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), identificado por Tigerstedt y Bergmann en 1898 y se define como un sistema peptidérgico con características endocrinas (Paul et al., 2006) (Figura 5). En este sistema, las células yuxtaglomerulares del riñón producen renina. La renina al hidrolizar al angiotensinogeno (glicoproteína que se produce en el hígado), lo convierte en angiotensina 1. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) convierte la angiotensina 1 en angiotensina 2, lo que provoca una vasoconstricción y por lo tanto, ocasiona que la presión arterial aumente (FitzGerald et al., 2004). Además, la angiotensina 2 estimula en las glándulas suprarrenales la producción de la hormona aldosterona encargada de reabsorber el sodio, la retención de agua provoca el aumento de la volemia (volumen total de sangre circulante), y por lo tanto también aumenta la presión arterial (Lavoie y Sigmund, 2003).

En la actualidad, existen en el mercado diferentes fármacos inhibidores de ECA sintéticos como Captopril, Benazapril, Enalapril y Fosinopril, que han reportado una potente actividad antihipertensiva; Sin embargo, han presentado efectos secundarios como hipotensión, aumento de los niveles de potasio, reducción de la función renal, tos, erupciones cutáneas y anomalías fetales (Parish y Miller, 1992; White et al., 2010). Por lo que se han explorado nuevos compuestos activos naturales que presentes la capacidad de inhibir la actividad de la ECA. En los últimos años se han identificado secuencias primarias de diferentes proteínas alimentarias (e.g. proteínas de la leche, pescado) que pueden ser liberadas mediante procesos hidrolíticos y utilizadas para este fin, (FitzGerald et al., 2004).

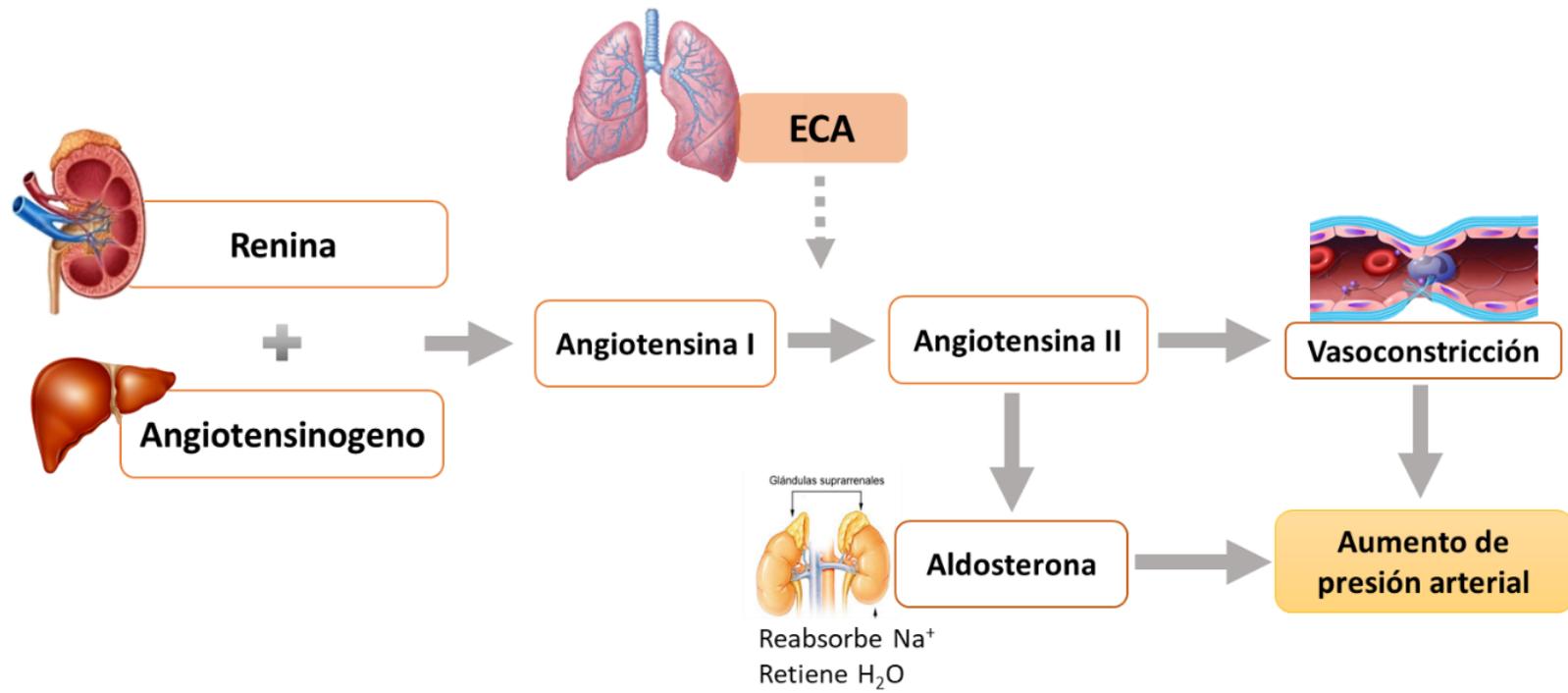


Figura 5. Esquema simplificado del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Adaptado de Brown y Vaughan (1998).

2.6.2. El Efecto Incretina y Acción de la Enzima DPP-IV

El efecto incretina se refiere a que al momento de ingerir alimentos se liberan ciertas hormonas desde el intestino delgado, potenciando la secreción de insulina, y ajustando su acción insulínica de forma dependiente de la glucosa (Savarese et al., 2017). Las hormonas incretinas más importantes son el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) (Ahrén, 2007). GIP es un polipéptido formado por 42 aminoácidos producido principalmente por células K del duodeno, este se libera en la circulación por la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos y grasa. GLP-1 es producido por las células L, que se localizan en la parte inferior del intestino delgado y su secreción es estimulada por alimentos ricos en grasas, carbohidratos y proteínas (Baggio y Drucker, 2007). Tanto GIP como GLP-1 se inactivan rápidamente tras su liberación, debido a la acción de la enzima Dipeptidil Peptidasa 4 (DPP-IV) (Lacroix y Li-Chan, 2014a).

En concentraciones normales o elevadas de glucosa, se aumenta la síntesis y liberación de insulina de las células β pancreáticas por efecto de GLP-1 y el GIP, por lo tanto, aumenta la captación tisular de la glucosa. Las hormonas incretinas son liberadas por el intestino a lo largo del día, sin embargo, aumentan sus niveles en respuesta a la ingesta de alimentos. La hormona de mayor relevancia en cuanto a su acción glucorreguladora es la GLP-1. Se ha postulado que este péptido participa en la disminución de la secreción del glucagón de las células α -pancreáticas y unido a los niveles altos de insulina se logra la reducción de la producción de glucosa hepática y por lo tanto una disminución de la glucemia (Baggio y Drucker, 2007; Lacroix y Li-Chan, 2012).

Las estrategias para aumentar la acción incretina se han basado en prolongar la vida media del GLP-1 en el torrente sanguíneo. Para esto se han explorado compuestos análogos del GLP-1 con mayor vida media e inhibidores de la enzima DPP-IV para evitar su degradación (Puig-Domingo y Pellitero, 2015). Los tratamientos con análogos de GLP-1 ofrecen una mayor selectividad, pero su disponibilidad es sólo en forma inyectable y pueden presentar diversos efectos secundarios (e.g., vómitos, náuseas), mientras que los

inhibidores de DPP-IV están disponibles oralmente y causan efectos secundarios mínimos de manera temporal (Lacroix y Li-Chan, 2012; Mentlein, 2005).

La enzima DPP-IV (EC 3.4.14.5) es una peptidasa que se ha encontrado ampliamente distribuida en células endoteliales, células epiteliales, células T, hepatocitos y fluidos corporales (Zhang et al., 2016). La acción principal de DPP-IV es escindir oligopéptidos después del segundo aminoácido desde el extremo N-terminal, con acción preferente si el segundo aminoácido es alanina (como en GLP-1) o prolina. La inactivación o degradación de incretinas por DPP-IV disminuye la secreción de insulina en presencia de nutrientes, aumentando la glucosa en el torrente sanguíneo (Nongonierma y FitzGerald, 2014). La degradación de GLP-1 por DPP-IV ocurre de manera rápida y eficiente, con una vida media inferior a 2 min. En condiciones de ayuno, el 40% del total de GLP-1 se encuentra intacto y solo el 60% después de la ingestión de la comida. La inhibición de DPP-IV prolonga sustancialmente vida media de GLP-1 (Baggio y Drucker, 2007). De manera general, la inhibición de DPP-IV mejoran la respuesta natural del cuerpo a la ingesta de alimentos, reduciendo los niveles de glucosa después de comer, por lo que han ganado un interés amplio y exitoso para el tratamiento de DM2 a nivel mundial mediante su inhibición (Zhang et al., 2016).

En el mercado existen diferentes fármacos inhibidores de DPP-IV como Denagliptin, Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin (Green et al., 2006), sin embargo, causan efectos secundarios mínimos de manera temporal como problemas gastrointestinales, que incluyen náuseas, diarrea y dolor de estómago y síntomas parecidos a la gripe: dolor de cabeza, secreción nasal, dolor de garganta. En la actualidad ha crecido el interés por desarrollar inhibidores naturales altamente eficaces. Existen varios estudios *in vitro* y algunos *in vivo* que han resaltado el potencial de los péptidos derivados de alimentos y que funcionan como inhibidores efectivos de DPP-IV (Jao et al., 2015).

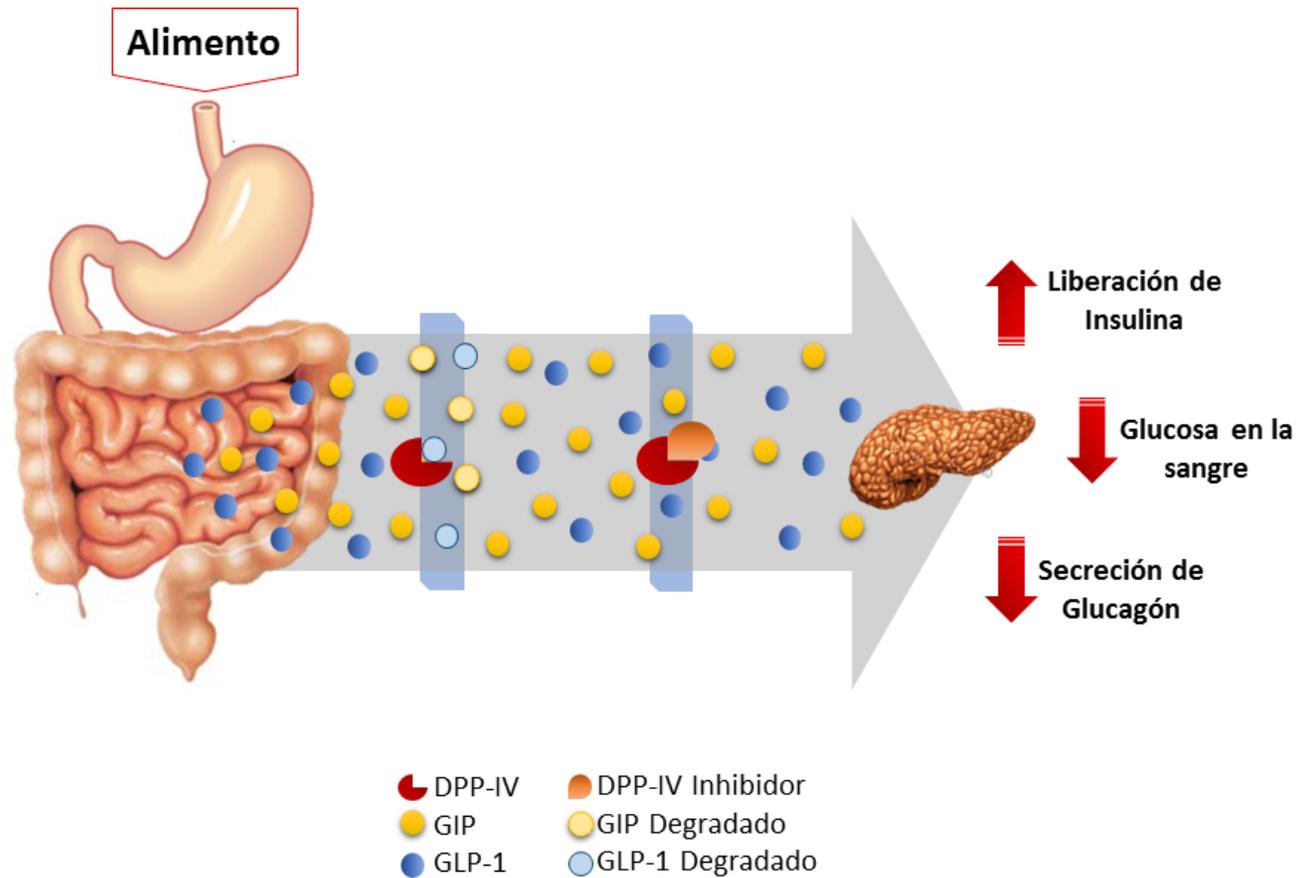


Figura 6. Esquema simplificado de la disminución de glucosa en la sangre por acción de inhibidores de DPP-IV. Adaptado de Baggio y Drucker (2007).

2.7 Hidrolizados Proteicos con Capacidad Inhibitoria de la Enzima DPP-IV y ECA

Algunos componentes dietéticos, como la fibra soluble, los compuestos fenólicos y algunos péptidos, muestran diversas propiedades antihiperglicémicas. Dichos compuestos pueden actuar como Inhibidores de enzimas digestivas (e.g., alfa-amilasa, DPP-IV), estimuladores de secreción de insulina (e.g., aminoácidos, ácidos grasos) y activación de receptores implicados en el metabolismo de la glucosa (Lacroix y Li-Chan, 2014b). En diversas investigaciones se ha reportado que hidrolizados de proteínas derivadas de fuentes animales, vegetales y marinas pueden contener péptidos con diversas actividades biológicas. En este contexto, se ha considerado a los hidrolizados de proteínas lácteas, como una fuente importante de péptidos y aminoácidos libres inhibidores de ECA y de la enzima DPP-IV (FitzGerald et al., 2004; Nongonierma y Fitzgerald, 2014).

Las proteínas lácteas son una de las fuentes principales para la obtención de péptidos antihipertensivos, que se pueden obtener por hidrólisis con diferentes enzimas, y también por fermentación de la leche con distintas bacterias (Hernández-Ledesma, et al., 2011). Dos de las secuencias peptídicas reportadas en leches fermentadas con alta actividad inhibitoria de la ECA, son valina-prolina-prolina (VPP) e isoleucina-prolina-prolina (IPP), secuencias presentes en β -CN y κ -CN. Las proteinasas de BAL tales como *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus helveticus* producen péptidos inhibidores de ECA *in vitro* (FitzGerald et al., 2004). Por otra parte, se ha reportado que la incubación adicional con proteasas como pepsina y tripsina incremento la liberación *in vitro* de péptidos inhibidores de la ECA a partir de caseínas y proteínas del lactosuero en productos lácteos fermentados (Pihlanto-Leppälä et al., 1998).

Péptidos con actividad inhibitoria de DPP-IV han sido encontrados en hidrolizados de proteínas de leche, huevo, salvado de arroz, maíz y pescado (Lacroix y Li-Chan, 2014b). Una gran diversidad de proteasas se ha utilizado para hidrolizar las proteínas y liberar péptidos con esta característica. Las diversas proteasas incluyen las de origen microbiano (e.g., Protamex® Alcalasa, Flavourzyme®), animal (e.g., pepsina, tripsina), y vegetal (e.g., papaína y proteasas de calabaza). La eficiencia en la liberación de péptidos

dependerá de la fuente y tipo de proteasas utilizadas, entre otros parámetros de hidrólisis (Mazorra-Manzano et al., 2017). Además, la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, sugiere que algunos péptidos inhibidores de DPP-IV pueden también generarse durante el proceso de digestión (Lacroix y Li-Chan, 2016).

2.8 Proteasas Vegetales en la Generación de Péptidos Bioactivos

Las proteasas de origen vegetal tales como la papaína, bromelina y ficina obtenidos de la fruta o latex de papaya, piña e higo, respectivamente, se han utilizado en una gran variedad de procesos industriales, alimentos e industria farmacéutica. Actualmente, las proteasas de plantas son el objeto de atención a causa de su actividad proteolítica en una amplia variedad de sustratos y su estabilidad en amplios intervalos de temperatura y pH (Feijoo-Siota y Villa, 2011). Gracias a estas características, en los últimos años el uso de proteasas de fuentes vegetales se ha utilizado para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, así como, para la liberación de péptidos con actividad biológica a partir de diferentes sustratos proteicos. Entre las propiedades bioactivas más evaluadas se encuentran la actividad antihipertensiva, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, entre otras (Tabla 2).

Por otro lado, diferentes enzimas de origen vegetal, presentan cierta especificidad hacia diferentes sustratos, lo que permite desarrollar procesos hidrolíticos para mejorar las características fisicoquímicas y nutricionales de proteínas específicas (Mazorra-Manzano et al., 2013). Sin embargo cuando se utilizan una mezcla de proteínas y enzimas no específicas, los productos de hidrólisis pueden resultar en mezclas complejas con fragmentos diferentes, y resulta difícil identificar péptidos con actividad biológica en este tipo de muestras (Alvarado-Carrasco y Guerra, 2010). El método más común para la producción de péptidos bioactivos a partir de diferentes proteínas es la hidrólisis enzimática (Hernández-Ledesma et al., 2011). En la liberación de péptidos inhibidores de actividad de la ECA, el uso de enzimas proteolíticas de distintas fuentes ha sido ampliamente usado y reportado, sin embargo, en la liberación de péptidos inhibidores de

DPP-IV el uso de enzimas proteolíticas de fuentes vegetales ha sido poco estudiado. La Tabla 3 recopila algunos estudios que se han realizado sobre el uso de estas proteasas en de la producción de péptidos inhibidores de DPP-IV.

Dentro de las investigaciones sobre el uso de proteasas de origen vegetal se encuentran los de Tavares et al., 2013 quienes realizaron un estudio *in vivo* para evaluar el efecto anti-inflamatorio y anti-nociceptivo (dolor) de una mezcla de péptidos concentrados obtenidos de proteínas de lactosuero hidrolizadas con *Cynara cardunculus*. Bertucci et al., 2015, purificaron parcialmente extractos de *Maclura pomifera* y prepararon hidrolizados de suero dulce, liberando péptidos bioactivos con actividad antioxidante e inhibición de la ECA. Sin embargo, a pesar de los diversos estudios que se tienen con respecto a la aplicación de algunas proteasas de plantas para liberar péptidos bioactivos a partir de proteínas de lactosuero, no se ha evaluado su eficiencia en dichos procesos utilizando esta fuente proteica (Li-jun et al., 2008).

Tabla 2. Uso de enzimas vegetales para la liberación de péptidos bioactivos en diferentes sustratos

Fuente de Enzima	Contenido enzimático	Presentación	Sustrato utilizado	Bioactividad evaluada	Referencia
Bromelina <i>(Ananas comosus)</i>	Proteasas tipo cisteína	Extracto crudo	Desechos de esqueleto de pescado	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Inhibición de ECA 	Gajanan y Elavarasan, 2016
		Enzima comercial	Plasma de ganado (Angus)	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Antimicrobiana 	Bah et al., 2016
<i>Cynara cardunculus</i>	Proteasas de tipo aspárticas	Extracto crudo	Proteínas de lactosuero	<ul style="list-style-type: none"> • Antiulcerogénica • Antinociceptiva • Anti-inflamatoria 	Tavares et al., 2011, 2013
<i>Jacaratia corumbensis</i>	NR	Extracto crudo	Caseína bovina	<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiana 	Arruda et al., 2012
<i>Maclura pomífera</i>	Proteasas tipo serina	Extracto crudo	Proteínas de lactosuero	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Inhibición de ECA 	Corrons et al., 2012
			Caseína bovina	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de ECA 	Corrons et al., 2017
Papaína <i>(Carica papaya)</i>	Proteasas tipo cisteína	Extracto crudo	Desechos de esqueleto de pescado	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Inhibición de ECA 	Gajanan y Elavarasan, 2016
			Plasma de ganado (Angus)	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Antimicrobiana 	Bah et al., 2016
			Enzima comercial	Quínoa	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de DPP-IV
			Proteínas de lactosuero		Le Maux, et al., 2016

NR: No reportado

Tabla 3. Condiciones enzimáticas en las que se liberan péptidos inhibidores de DPP-IV de proteínas de lactosuero

Enzima	Condiciones de hidrólisis	Proteína	Secuencia peptídica identificada	Localización	IC ₅₀ (μM)	Referencia
Tripsina	1 g proteína /20 mL (Tris-HCl 0.01 M, pH7) con 10 mg de enzima (37 °C/24h) 5% proteína tratada termicamente (90 °C/10 min). Enzima:Sustrato 1:20 (p:p) pH 8), 37 °C/3h.	β-Lactoglobulina	VAGTWY	f(15-20)	174	Uchida et al., 2011
			IPAVF	f(78-82)	44.7	Silveira et al., 2013
			VAGTWY	f(15-20)	174	
			TPEVDDEALEK	f(125-135)	319.5	
			IPAVFK	f(78-83)	143	
Pepsina	Enzima: Sustrato (4% p:p) pH 2.0; 37 °C por 60 min.	α-Lactoalbúmina	VLVLDTDYK	f(92-100)	424.4	Lacroix y Li-Chan, 2014a
			WLAHKAL		286	
			WLAHKALCSEKLDQ		141	
			LAHKALCSEKL		165	
			LCSEKLDQ		186	
		β-Lactoglobulina	TKCEVFRE		166	
			IVQNNDSTEYGLF		337	
			ILDKVGINY		263	
			LKPTPEGDL		45	
			LKPTPEGDLEIL		57	
			IPAVFKIDA		191	
Thermoas a PC10F + Accelerzyme® CGP	Enzima Thermoase PC10F a 65 °C/3h. pH 6.9. Seguido con Accelerzyme® CGP a 37 °C/7h, pH 4	β-Lactoglobulina	LKPTPEGDLE		42	Lacroix et al., 2016
			LKPTPEGDLEIL		57	
			IQKVAGTW		329	
			VLDTDY		471	
		α-Lactoalbúmina	LKALPMH		193	
			LKGYGGVSLPE		486	
			WLAHKAL		286	

3. HIPÓTESIS

Las proteasas provenientes de nuevas fuentes vegetales son enzimas eficientes para hidrolizar las proteínas de lactosuero y producir hidrolizados proteicos con alta capacidad para inhibir las enzimas DPP-IV y ECA *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la eficiencia hidrolítica de extractos enzimáticos de trompillo, melón, y papaya sobre las proteínas de lactosuero para producir péptidos inhibidores de DPP-IV y ECA *in vitro*

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad hidrolítica de los extractos enzimáticos de trompillo, melón y (papaína) en la hidrólisis de proteínas del lactosuero, mediante el grado de hidrólisis y perfil hidrolítico por electroforesis SDS-PAGE.
- Evaluar la actividad inhibidora de la DPP-IV y ECA (IC_{50}) en fracciones peptídicas <3 kDa, de los hidrolizados producidos con proteasas vegetales y su comparación con pepsina.
- Identificar fracciones ricas en péptidos inhibidores DPP-IV y ECA (IC_{50}) mediante la separación cromatográfica de la fracción <3 kDa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materia Prima

El lactosuero se recolectó en queserías artesanales productoras de queso fresco del Ejido la Victoria, Hermosillo, Sonora, México en el periodo de septiembre a noviembre de 2017. Con la finalidad de obtener homogeneidad en la muestra, se liofilizaron tres lotes de lactosuero en FreezeDryer (Labconco Corporation Kansas City, MO, EE.UU.), los cuales se incorporaron en uno solo lote para su almacenamiento a -20°C hasta su posterior uso.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico marca Sigma (St.Louis, MO, EE.UU.), cuando no se indique lo contrario.

5.2 Determinación de Características Fisicoquímicas del Lactosuero.

El análisis de composición química que incluyó, sólidos totales, proteína y cenizas se determinó siguiendo la metodología descrita en la AOAC (2000). Para el cálculo de proteína total, el nitrógeno total determinado por micro-kjedahl se convirtió a proteína utilizando un factor de conversión de 6.38. El porcentaje de sólidos totales se determinó gravimétricamente por diferencia en peso entre la muestra inicial y la muestra deshidratada. El contenido de cenizas se estimó por el peso del residuo inorgánico resultante, después de que la materia orgánica fue incinerada. Los análisis se realizaron por triplicado.

5.3 Preparaciones Enzimáticas

El melón blanco (*Cucumis melo*) en estado de madurez comercial, se obtuvo de un mercado local de la Ciudad de Hermosillo, Sonora. Los frutos de trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) maduros fisiológicamente se recolectaron en el campus de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua. Las enzimas pepsina (10,000 NF) y papaína (5000TU/mg) fueron de grado comercial y adquiridas de Nanning Pangbo Enzyme (Nanning Pangbo Biological Engineering Co., Ltd, China).

La obtención del extracto crudo de melón blanco, se realizó de acuerdo a Mazorra-Manzano et al., 2013 utilizando fruta fresca para obtener su jugo mediante la homogenización del mesocarpio en un procesador de alimentos Osterizer modelo 450-10 (Osterizer Mexicana, S.A.). La muestra homogeneizada fue centrifugada a 5000 xg a 4°C durante 30 min utilizando una centrifuga Sorvall ST16 (ThermoFisher Scientific Inc, Alemania), el sobrenadante se filtró con manta cielo para eliminar partículas en suspensión. El extracto fue liofilizado y almacenado a -20°C hasta su uso.

Para la obtención del extracto crudo de trompillo, frutos de trompillo seco en polvo se homogenizaron en agua bidestilada en relación 1:10 (p:v) utilizando un procesador de alimentos Osterizer modelo 450-10. El homogeneizado se dejó reposar durante 8 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 7000 xg durante 30 min a 4°C, en una centrifuga Sorvall ST16. El sobrenadante obtenido por decantación, se liofilizó y posteriormente se almacenó a -20°C para su uso posterior.

5.4 Determinación de la Actividad Proteolítica y Concentración de Proteína de los Extractos Enzimáticos

La concentración de proteína de los extractos crudos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories), basado en el método de Lowry en formato de micro

placa. El ensayo consistió en mezclar 5 μ L del extracto con 25 μ L de reactivo A y 200 μ L de reactivo B. La mezcla fue incubada por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se registró la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de microplaca SpectraMax M3 (Molecular Devices. EE. UU). La concentración de proteína se determinó a partir de una curva de calibración utilizando albumina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 0.24, 0.6, 0.84, 1.2 y 1.5 mg/mL.

La actividad proteolítica se determinó por el método reportado por Moreno-Hernández (2013) el ensayo consistió en la incubación a 37 °C por 60 min de 50 μ L del extracto enzimático y 450 μ L de caseinato de sodio al 1% (pH 7.0) como sustrato. Posterior al periodo de incubación, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p:v). Una muestra testigo fue preparada bajo el mismo procedimiento, pero sin incubación con la adición directa de TCA. Todas las mezclas se mantuvieron en baño de hielo por 30 min y posteriormente centrifugadas a 15000 xg por 30 min a 4°C. Se registró la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. La actividad proteolítica se expresó como unidades de actividad proteolítica específica, que se definen como el incremento de absorbancia en una unidad bajo las condiciones del ensayo por la concentración de proteína.

5.5 Preparación de Hidrolizados de Lactosuero con Diferentes Preparaciones Enzimáticas

5.5.1 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Pepsina

Los hidrolizados de suero con pepsina fueron desarrollados de acuerdo a (Lacroix & Li-Chan, 2013) con ligeras modificaciones. Se realizó una solución de lactosuero en polvo con 3% de proteína (p/v) en agua destilada y se agregó 0.02 % de azida de sodio, se ajustó a pH 2.0 y se pre incubó a 37 °C en un baño de agua Orbital Shaker Bath (Lab-Line 3540). Posteriormente se añadió la pepsina al 4 % en relación enzima:sustrato en base a proteína

(p:p) y la mezcla se incubó a 37 °C bajo agitación constante durante 60 min. El hidrolizado se centrifugó a 5000 xg a 4 °C durante 20 min en una centrífuga Sorvall ST16 (ThermoFisher Scientific Inc, Alemania). El protocolo para la preparación de los hidrolizados, se siguió íntegramente como lo describe Lacroix et al., (2013), con el fin de comparar los resultados obtenidos con lo reportado. Una parte del sobrenadante se filtró con una membrana de 3 kDa y el permeado (<3 kDa) se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

5.5.2 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Papaína

Los hidrolizados de lactosuero con papaína se prepararon como lo describe (Le Maux et al., 2016) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de lactosuero en polvo con 3 % de proteína (p/v) en agua destilada, se ajustó a pH 7 y pre incubó a 50 °C durante 30 min en un baño de agua con agitación. La enzima se añadió al 2 % en relación enzima:sustrato en base a proteína (p/p). La hidrólisis se llevó a cabo a 50 °C con agitación constante durante 3 h. La hidrólisis se terminó por inactivación por calor de la enzima en un baño de agua a 100 °C durante 30 min. El hidrolizado se centrifugó a 5000 xg a 4 °C durante 20 min en centrífuga Sorvall ST16. El protocolo para la preparación de los hidrolizados, se siguió íntegramente como lo describe Lacroix et al., (2013), con el fin de comparar los resultados obtenidos con lo reportado. Una parte del sobrenadante se filtró con una membrana de 3 kDa y el permeado (<3 kDa) se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su análisis posterior.

5.5.3 Hidrolizados de Lactosuero Preparados con Extractos Enzimáticos de Melón y Trompillo

Para la obtención de los hidrolizados de lactosuero con los extractos crudos enzimáticos, se preparó una solución de lactosuero en polvo con 3 % de proteína (p:v) en agua destilada y soluciones de extractos crudos de melón y trompillo conteniendo 9 y 10 U/mL, respectivamente. Los hidrolizados se prepararon incubando el lactosuero con los extractos de melón y trompillo en relación 5:95 y 10:90 (v:v), e incubadas a 60 °C durante 3 h. La hidrólisis se frenó sumergiendo los hidrolizados en hielo, posteriormente, se centrifugó a 5000 xg a 4 °C durante 20 min en centrífuga Sorvall ST16. Una parte del sobrenadante se filtró con una membrana de 3 kDa y el permeado (<3 kDa) se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su análisis posterior.

5.6 Eficiencia de las Proteasas Sobre la Degradación Proteolítica de las Proteínas del Lactosuero

5.6.1 Análisis del Perfil Hidrolítico por Electroforesis SDS-PAGE

Para evaluar el perfil proteico de los hidrolizados, se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a Laemmli (1970) bajo condiciones desnaturizantes y reductoras, utilizando un gel de resolución de 15% y un gel de 4% para la zona de apilamiento. Las muestras (extractos crudos e hidrolizados) se mezclaron con solución 2X SDS (Tris-HCl 0.15 M pH 6.8, SDS 1.2 %, glicerol 30 %, β -mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0.001 %) en relación 1:1 (v:v). Posteriormente se mantuvo a 100 °C por 5 min para su desnaturización. Las muestras se cargaron a una misma concentración de proteína en cada carril ajustando el volumen inyectado. La separación se realizó a

corriente constante de 120 V durante 2 h utilizando un sistema mini PROTEAN 3 cell Bio Rad (BioRad, Richmond, CA, USA).

Después de la separación electroforética los geles se tiñeron con solución Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.25 % (en 45 % metanol, 10 % ácido acético y 45 % agua), durante 3 h. Posteriormente se destiñeron en solución de metanol: ácido acético: agua (45:10:45 %, v/v/v) para su posterior fotodocumentación utilizando un scanner ChemiDoc XRS con software Image Lab de BioRad (BioRad, Richmond, CA, EE.UU.).

5.6.2 Determinación del Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se cuantificó usando el método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) descrito por Adler-Nissen (1979), con breves modificaciones, las muestras se mezclaron con solución de SDS al 1 % y se incubaron a 80°C por 30 min. Se mezclaron 41.66 µL de la muestra con 333 µL de amortiguador de fosfato de sodio (0.2125 M, pH 8.2) y 333 µL de 0.10 % (p:v) de TNBS, seguido por la incubación en condiciones de obscuridad por 60 min a 50°C. La reacción se detuvo por la adición de 666 µL de HCl 0.1N y la absorbancia se registró a 340 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Se utilizó una curva estándar de Leucina en el rango de concentración de 0-4 µM/mL en SDS 1 % para la determinación del contenido en grupos amino libres de las muestras (AN, en mg/g de proteína). El GH se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$GH (\%) = \frac{AN_2 - AN_1}{Nep} \times 100 \quad (1)$$

Dónde: AN₁ es el contenido de grupos aminos antes del hidrólisis, AN₂ es el contenido de grupos aminos después del hidrólisis y Nep el contenido de grupos aminos de los enlaces peptídicos en la proteína sustrato.

Se utilizó el valor de 123.3 mg/g como el contenido de grupos aminos de los enlaces peptídicos en el lactosuero (*Nep*) (Spellman et al., 2003).

5.7 Identificación de Fracciones Peptídicas por Cromatografía de Exclusión Molecular

Las fracciones ultrafiltradas <3 kDa de los distintos hidrolizados se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando un sistema ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire England, UK). El sistema de separación consistió de una columna Superdex Peptide 10/300 GL (10 mm x 300 mm) y detección a 280 nm. Se cargaron 100 µL de las muestras previamente disueltas en solución amortiguadora PBS (fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7) a una concentración de 100 mg/mL. El flujo de la solución PBS fue de 0.6 mL/min. Se utilizó como marcadores de peso molecular a la Aprotinina (6.5 kDa), Vitamina B12 (1.4 kDa) y Tirosina (163 Da). Se colectaron 4 fracciones de acuerdo a los picos observados en los perfiles de elución. El procedimiento se repitió 5 veces para obtener suficiente muestra las cuales fueron posteriormente liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis posterior.

5.8 Ensayo de Inhibición de Actividad de la Enzima DPP-IV

El ensayo de inhibición de actividad de DPP-IV se realizó según Lacroix y Li-Chan (2012) con algunas modificaciones. El ensayo consistió en diluir las muestras liofilizadas en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 a diferentes concentraciones. En una microplaca de 96 pocillos, se pre-incubaron 25 µL de la muestra diluida con 25 µL de Gly-Pro-p-nitroanilida (1.59 mM) a 37 °C durante 10 min, después se añadieron 50 µL de DPP-IV (0.045 unidades/mL) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. La reacción se frenó mediante la adición de 100 µL de amortiguador de acetato de sodio 1M, pH 4.0 y la

absorbancia de las muestras se determinó a 405 nm. El porcentaje de inhibición de DPP-IV se definió como:

$$\text{Inhibición de Actividad DPP IV (\%)} = 100 * [1 - (\frac{A-Ab}{Cp-Cn})] \quad (2)$$

Dónde: A corresponde a la actividad de DPP-IV con inhibidor (muestra), en Ab DPP-IV fue reemplazado con Tris-HCl (100 mM, pH8.0). El control positivo (Cp) corresponde a la actividad de DPP-IV sin inhibidor y en el control negativo (Cn) se utilizó Tris-HCl (100 mM, pH8.0) en lugar de la muestra y de DPP-IV

La concentración del hidrolizado peptídico requerido para causar una inhibición del 50% de la actividad de la enzima DPP-IV (valor de IC₅₀) se determinó midiendo el porcentaje de inhibición de la enzima DPP-IV obtenida a tres concentraciones de proteína diferente mediante una curva de regresión lineal.

5.9 Ensayo de Inhibición de Actividad de la ECA

El ensayo de inhibición de la actividad de la ECA se realizó según Wu, et al., (2002), el cual consistió en mezclar el sustrato Hipuril-Histidil-Leucina (HHL, 2.17mM) con solución amortiguadora de boratos (100mM conteniendo 300mM de NaCl, pH 8.3), la enzima ECA (2mU/mL) y el inhibidor en diferentes concentraciones (ver Tabla 4) en un volumen final de 70 µL. El sustrato HHL mezclado con la muestra, así como, la ECA se atemperaron a 37 °C durante 10 min; posteriormente las dos soluciones se combinaron y se incubaron en un Eppendorf Thermomixer R Mixer (Brinkmann Instruments, Ney York, EE.UU) con agitación constante a 450 rpm durante 30 min a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación la reacción se detuvo con la adición de 85 µL de HCl 1M.

Tabla 4. Mezcla de reacciones para ensayo de inhibición de actividad de ECA

Reacción	Sustrato (μL)	Buffer (μL)	ECA (μL)	Muestra (μL)	Total
Sustrato	50	20	-	-	70
Sustrato+Enzima	50	10	10	-	70
Muestra	50	-	10	10	70

El análisis de los productos de reacción ácido hipúrico (AH) y HHL se realizó por cromatografía líquida (HPLC) para lo cual se utilizó un sistema HPLC Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Germany) con columna ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 X 100 mm, 3.5 μm), con detección a 228 nm. El sistema de elución fue con solvente A: agua DI (deionizada) (con 0.05 % de ácido trifluoroacético) y solvente B: acetonitrilo (con 0.05 % de ácido trifluoroacético), con flujo constante de 0.5 mL/min. El programa de elución fue: un gradiente de acetonitrilo (solvente B) de 5 a 60 % durante 10 min, dos min con el solvente B a 60% y posteriormente una reducción en gradiente de 60 % a 5 % B en un minuto y mantenido a 5 % B por 4 min. El % de inhibición de la actividad de la ECA se definió como:

$$\text{Inhibición de ECA (\%)} = \frac{A-B}{A} * 100 \quad (3)$$

Dónde: A: corresponde al área del ácido hipúrico (AH) resultante de la reacción del sustrato (HHL) y la enzima (ECA). B: Área del ácido hipúrico (AH) resultante de la reacción del sustrato (HHL) y la enzima (ECA) en presencia del inhibidor

La concentración del hidrolizado peptídico o fracción cromatográfica requerido para causar una inhibición del 50 % de la actividad de la ECA (valor de IC₅₀) se determinó midiendo el porcentaje de inhibición de ECA obtenida usando la solución peptídica a tres concentraciones de diferentes mediante un análisis de regresión lineal.

5.10 Análisis Estadístico

En la primera parte del experimento, se aplicó un diseño estadístico completamente al azar y análisis de varianza de una sola vía, siendo el factor principal el tipo de enzima y el porcentaje de inhibición de las enzimas (DPP-IV o ECA) y el grado de hidrolisis como variables respuesta. En la segunda parte del experimento, se aplicó un análisis de varianza

de dos vías para observar el efecto del tipo de enzima y fracción cromatográfica de los diferentes hidrolizados de lactosuero en la inhibición de la actividad de la enzima DPP-IV y ECA. En caso de existir diferencias se realizó la comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con una confianza del 95%. El análisis se realizó con el paquete estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características Fisicoquímicas del Lactosuero

Las características fisicoquímicas del lactosuero pueden variar considerablemente según el tipo de queso del cual deriva (e.g. fresco, de hebra), las etapas del proceso de elaboración (e.g. suero primario o secundario), así como las características fisicoquímicas de la leche utilizada en el proceso de quesería (El-Salam et al., 2009). La Tabla 5, muestra la composición del lactosuero utilizado en el presente estudio para la producción de los hidrolizados proteicos. Las muestras de lactosuero presentaron un pH cercano a la neutralidad clasificándolo como lactosuero dulce. El contenido de humedad, sólidos totales, proteína y cenizas es similar a lo reportado por la literatura para este tipo de lactosuero (Blaschek et al., 2007; Smithers, 2008), constituido principalmente por agua (>92 %) y con un contenido de sólidos totales entre 6 y 8%. Debido a la composición variable, se formó una sola muestra homogénea proveniente de las 3 muestras liofilizadas, obteniéndose un polvo con 15.22% de proteína, el cual fue utilizado para la producción de los 4 tipos de hidrolizados.

Tabla 5. Composición fisicoquímica del lactosuero dulce (base húmeda)

Muestra	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)
Suero Dulce (pH 6.3 - 6.5)	93.5 (93 – 94)	6.7 (6.3 – 7.0)	1.0 (0.7 - 1.2)	0.4 (0.3 - 0.4)

Los valores corresponden al promedio de tres muestras distintas de lactosuero.

El rango del contenido de los componentes encontrado en las tres muestras de lactosuero, se muestra en paréntesis

6.2 Características de las Preparaciones Enzimáticas

Los extractos enzimáticos de melón y trompillo, generalmente contienen una gran diversidad de proteínas que pueden o no relacionarse con la actividad proteolítica (Mazorra-Manzano et al., 2013; Chávez-Garay et al., 2016) por lo que la determinación de ambas características suele ser relevante. El agua, participa directamente en muchas reacciones químicas así como en las interacciones moleculares (Ó'Fágáin y Colliton, 2017), por lo tanto, la eliminación del agua de los diferentes preparados enzimáticos permitió que las enzimas presentes en ellos sea estable para su uso posterior. El extracto de melón blanco (*Cucumis melo*) en polvo utilizado en este estudio, presentó un contenido de proteína de 26.2 %, y una actividad enzimática específica de 0.44 unidades (U, unidades/mg proteína) mientras que para el extracto de trompillo (*Solanum eleagnifolium*) en polvo presentó un valor de 78.2 % de proteína y actividad enzimática de 0.20 U, utilizando caseinato de sodio como sustrato

6.3 Propiedades Fisicoquímicas de los Hidrolizados Preparados

La Figura 7 muestra el perfil proteolítico de las proteínas del lactosuero, analizado por electroforesis en gel (SDS-PAGE) durante la hidrólisis enzimática. El perfil en SDS-PAGE muestra que existen diferencias hidrolíticas entre las diferentes enzimas sobre las proteínas mayoritarias del lactosuero, y preferencia sobre ciertas proteínas individuales del lactosuero. Al evaluar el grado de hidrólisis (%GH) se observaron diferencias significativas entre los hidrolizados ($p < 0.05$) (Tabla 6). Los hidrolizados proteicos con mayor GH fueron los producidos con los extractos enzimáticos de melón (7.8 %GH) y papaína (6.7 %GH) respecto al hidrolizado producido con pepsina (4.7 %GH), sin embargo, esta última no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$) con el hidrolizado con trompillo (3.9 %GH).

Se puede observar que en el hidrolizado de lactosuero utilizando pepsina (Figura 7A, línea 4), β -Lg mostró mayor resistencia a la hidrólisis enzimática. Dicha resistencia de β -Lg a la degradación por pepsina ha sido ampliamente reportada (Lacroix y Li-Chan, 2013; Reddy et al., 1988), esta característica se debe a su estabilidad estructural a pH bajo (pH < 3) (Peram et al., 2013), sin embargo, pepsina fue eficiente en degradar el resto de las proteínas del lactosuero. Por otro lado, entre el hidrolizado de pepsina y de trompillo, aunque estadísticamente no hay diferencias ($p < 0.05$) en el % GH, en el perfil de degradación de los mismos si las hay. Lo anterior es debido a que la degradación de las proteínas no es un indicativo de la liberación de grupos aminos libres por efecto de la hidrólisis.

La figura 7B corresponde a la fracción <10 kDa de los hidrolizados proteicos, en donde se pueden observar bandas de bajo peso molecular en todos los hidrolizados, en el caso del hidrolizado de trompillo (7B, línea 2) se puede observar una banda muy marcada cerca de 3kDa, lo que significa que el tamaño de péptidos obtenidos de las proteínas del lactosuero por efecto del extracto de trompillo son de mayor tamaño en comparación con los demás hidrolizados, por lo tanto, el % GH también fue menor como se expresa en la tabla 6.

En el hidrolizado de lactosuero producido con papaína se observó una alta degradación de la mayoría de las proteínas del lactosuero (Figura 7A, línea 3). Se obtuvo un GH de 6.7%, el cual fue ligeramente superior al reportado en la literatura para aislado de proteínas de lactosuero (4.31-5.36%) (Le Maux et al., 2016). Se ha reportado que el tratamiento térmico, en este caso, la inactivación térmica al que fue sometido este hidrolizado, posterior a la incubación, puede conducir a algunos reordenamientos estructurales dentro de proteínas y péptidos y generar una hidrólisis adicional durante este proceso (Foegeding et al., 2002). Lo anterior explicaría el grado de hidrólisis alto para el hidrolizado preparado con papaína en comparación con los otros hidrolizados que no tuvieron un tratamiento térmico. La papaína es una endopeptidasa que tiene preferencia en enlaces peptídicos conformados con lisina, arginina y valina, y su efecto hidrolítico se observó de manera eficiente sobre todas las proteínas del lactosuero, ya que estas proteínas poseen un alto contenido de estos aminoácidos.

Por otro lado, las proteasas del melón blanco dieron como resultado un mayor GH (7.8%) (Tabla 6). Se han reportado diferentes endopeptidasas en extractos de melón, las cuales poseen amplia especificidad sobre diferentes sustratos proteicos o proteínas de lactosuero (Feijoo-Siota y Villa, 2011). Se observó que las proteasas del melón degradaron eficientemente β -Lg y α -La al igual que papaína, sin embargo, su acción proteolítica sobre proteínas de alto peso molecular fue menor (Figura 7A, línea 1). Por otro lado, el uso de proteasas de trompillo se ha limitado a la fabricación de quesos artesanales; sin embargo, la preferencia sobre las proteínas del lactosuero no se ha estudiado a profundidad. Aunque las proteasas de trompillo no se han caracterizado completamente, algunos estudios sugieren que los extractos crudos de trompillo son una mezcla de endopeptidasas y exopeptidasas (Chávez-Garay et al., 2016). Se puede observar que las proteasas de trompillo tienen un efecto hidrolítico menor sobre las proteínas del lactosuero, reflejado en un menor grado de hidrólisis (3.78 %) y una mayor preferencia hidrolítica sobre α -La y β -Lg, dejando casi intactas proteínas de mayor peso molecular como Inmunoglobulina, Lactoferrina o BSA (Figura 7A, línea 2). De igual forma, se puede observar una mayor intensidad de proteínas y péptidos en el rango de peso molecular de 15-25 kDa, debido a una menor proteólisis.

Respecto a la capacidad hidrolítica de las enzimas para la generación de péptidos a partir de las proteínas del lactosuero, se pudo observar que la fracción <3 kDa del hidrolizado de lactosuero utilizando papaína contenía el 16% de la proteína total utilizada para la preparación de los hidrolizados, por otro lado, la fracción <3 kDa de los hidrolizados utilizando melón y trompillo contenían el 12% y el hidrolizado preparado con pepsina contenía el 11% de la proteína total.

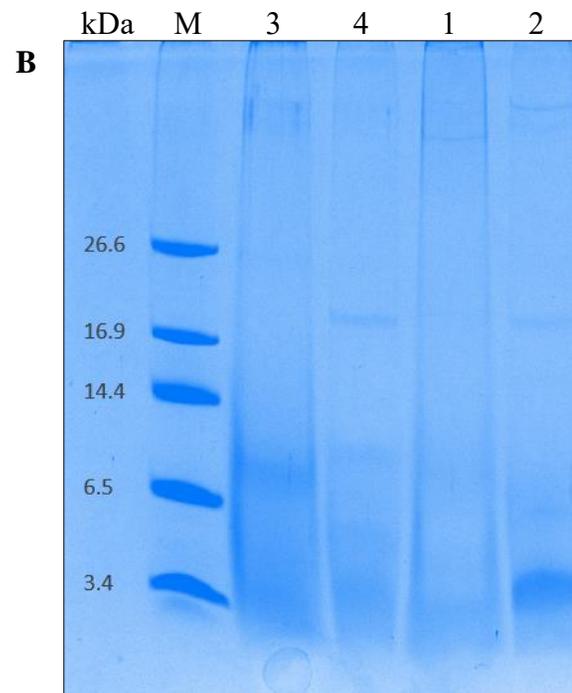
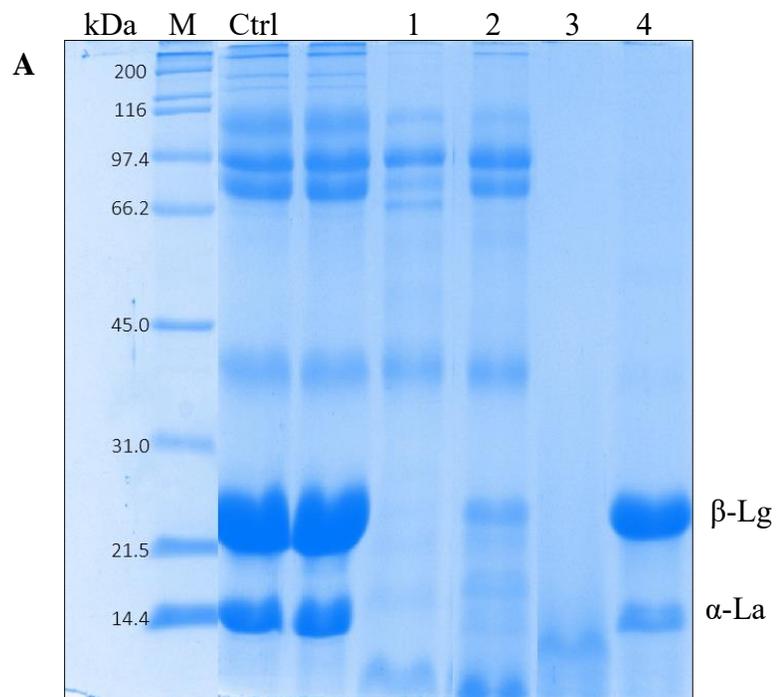


Figura 7. Perfil típico de separación de proteínas de lactosuero e hidrolizados

M: Marcador de peso molecular; **Ctrl:** Control; **1:** Hidrolizado melón; **2:** Hidrolizado trompillo; **3:** Hidrolizado papaína; **4:** Hidrolizado pepsina. En la figura 7A se inyectaron 45 μg de proteína en cada carril. En la figura 7B se inyectaron 85 μg de proteína.

Tabla 6. Grado de hidrólisis de los diferentes hidrolizados

Hidrolizado	Grado de Hidrólisis (%)*
Melón	7.83±1.34 ^a
Trompillo	3.98±0.09 ^b
Papaína	6.79±0.26 ^a
Pepsina	4.76±0.41 ^b

Los valores representan la media ± desviación estándar de dos experimentos.

*Medias que no comparten literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

6.4 Perfil de Elución de la Fracción < 3 kDa Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular

Los resultados de la cromatografía de exclusión molecular (CEM), se expresan como un perfil de elución o cromatograma que muestra la variación en la concentración de péptidos, en términos de absorbancia UV a 280 nm. En las Figuras 8 y 9 se pueden observar los perfiles de elución de las diferentes fracciones <3 kDa obtenidas por ultrafiltración, de los cuales se recolectaron 4 fracciones (se les etiquetó con la primera letra del tipo de enzima) a las que posteriormente se les evaluó la actividad inhibitoria de DPP-IV y ECA. Aunque para monitorizar la separación de péptidos se recomienda utilizar una longitud de onda a 214 nm, ya se ha reportado que en CEM se pueden observar perfiles de elución similares a 280 nm (Lacroix et al., 2016; Kilara y Vaghela, 2018).

El uso de estándares de peso molecular, permitió identificar que las secuencias peptídicas de la fracción 1 de los diferentes hidrolizados (Figura 8 y 9) son de tamaño molecular >1.74 kDa, la fracción 2 se encuentran en el rango de 0.25 a 1.74 kDa mientras que las fracciones 3 y 4 son <0.25 kDa. Esta clasificación de tamaños molecular, sólo da una aproximación de la distribución molecular de los péptidos presentes en las diferentes fracciones de los hidrolizados y no del tamaño real de las secuencias peptídicas, ya que este está definido por la eficiencia de la columna, así como la estructura y/o conformación de los péptidos (Su et al., 2013).

En la figura 8B que pertenece al perfil de elución por CEM del hidrolizado de trompillo, se pueden observar picos de elución entre 32 y 40 mL los cuales fueron colectados, sin embargo, el contenido de proteína no fue detectable y por tanto no fue considerada para su análisis de bioactividad.

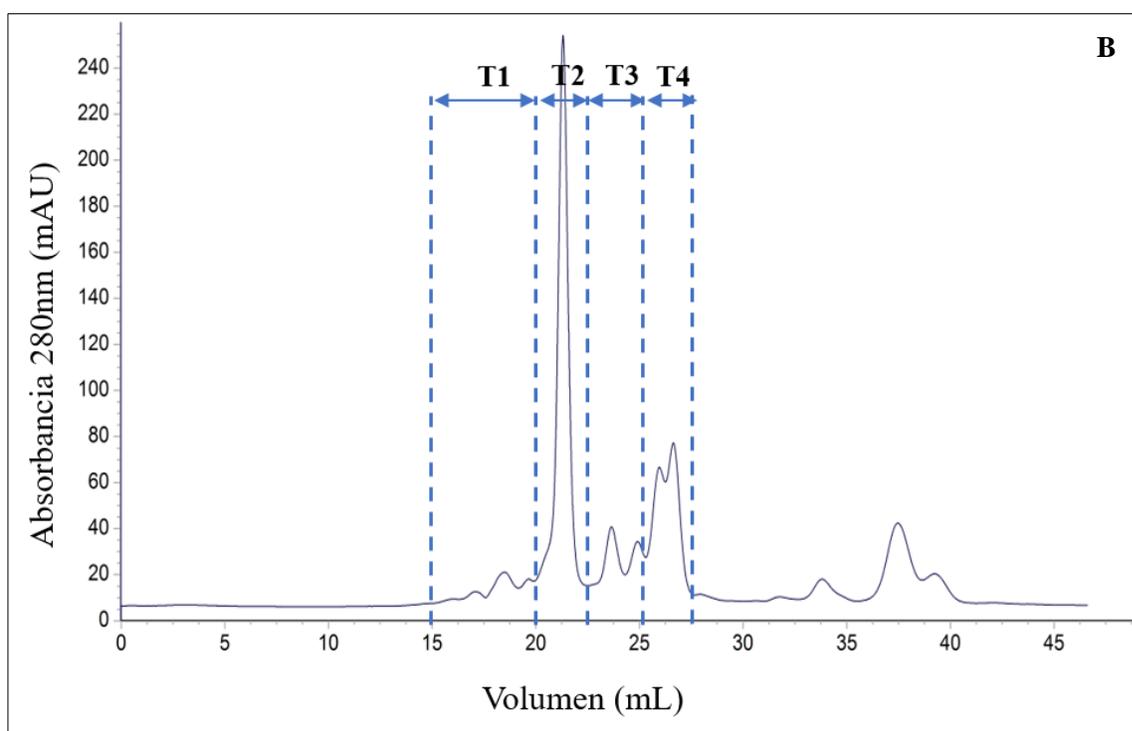
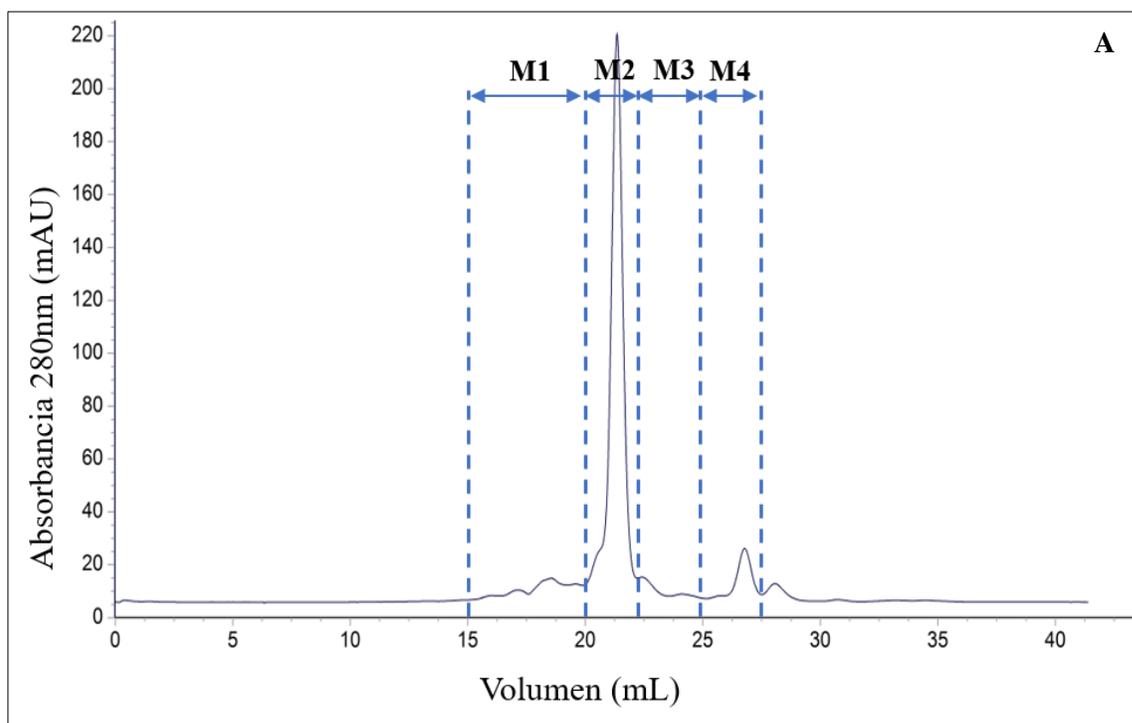


Figura 8. Perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados de lactosuero con Melón (A) y Trompillo (B).

M: Indica el número de fracción del hidrolizado de melón y **T:** Indica el número de fracción del hidrolizado de trompillo.

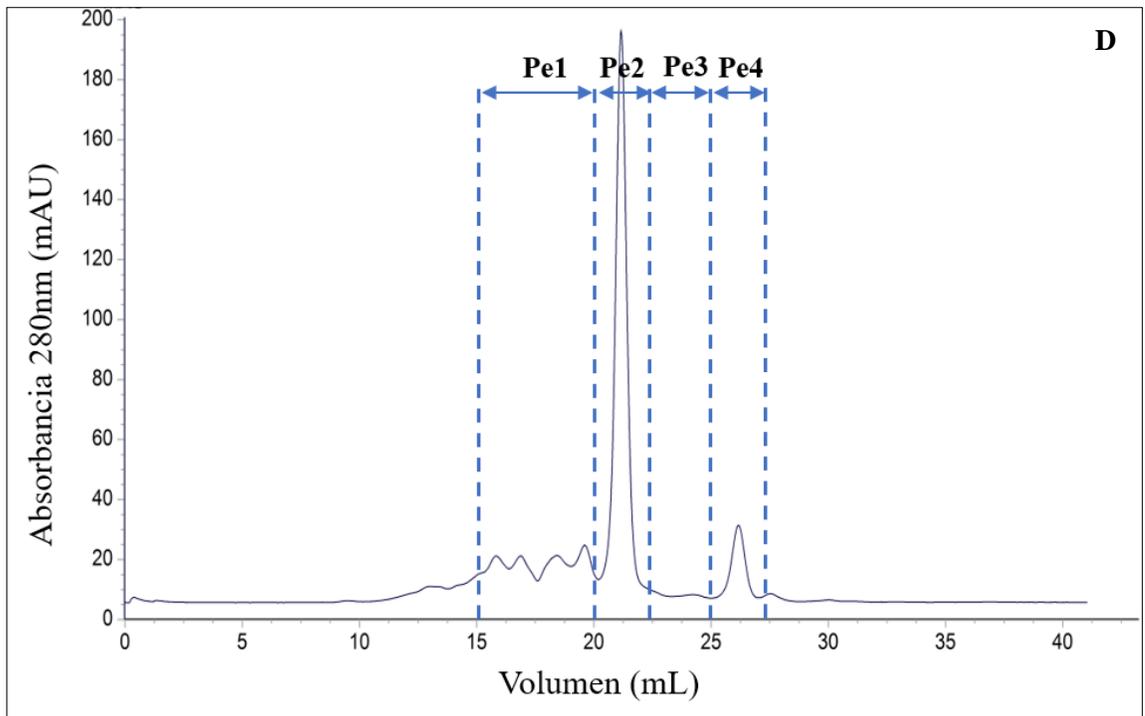
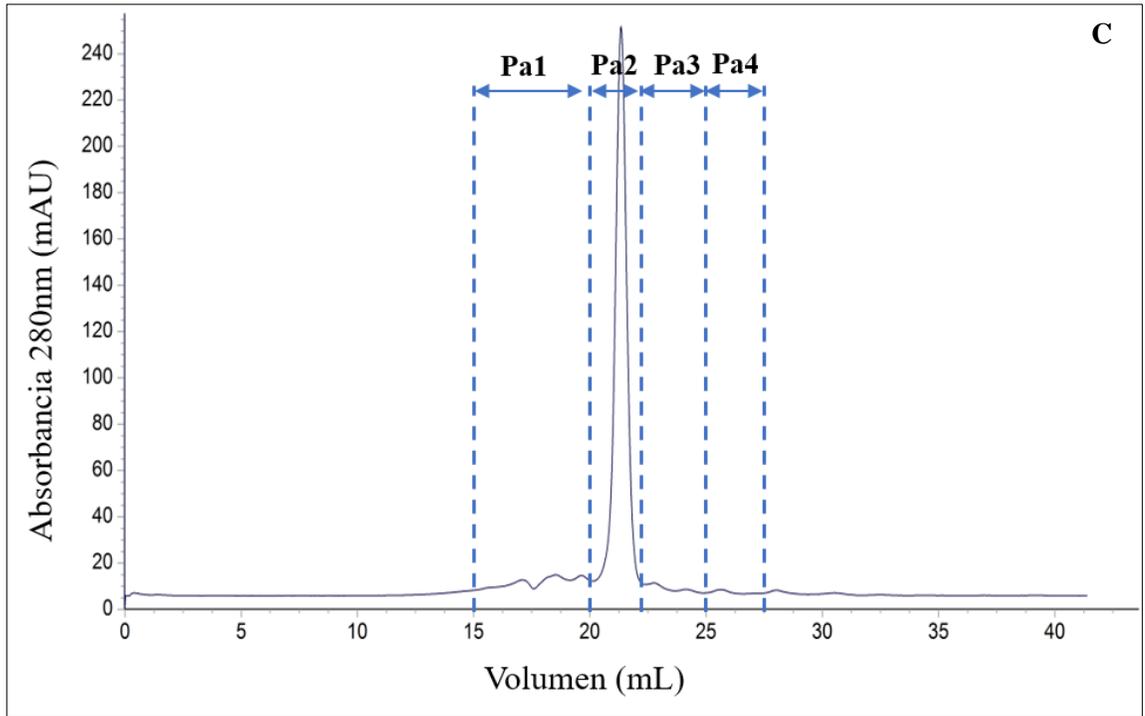


Figura 9. Perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados de lactosuero con Papaína (C) y Pepsina (D).

Pa: Indica el número de fracción del hidrolizado de papaína y **Pe:** Indica el número de fracción del hidrolizado de pepsina

6.5 Inhibición de las Enzimas DPP-IV y ECA por los Hidrolizados Proteicos y sus Fracciones

Se ha demostrado, que las proteínas mayoritarias del lactosuero sin hidrolizar, tienen una actividad biológica baja, pero al hidrolizarlas se obtienen péptidos con alta bioactividad (Akal, 2017). Además, se ha reportado que los péptidos con actividad biológica están constituidos de 2 a 20 aminoácidos, por lo tanto, la fracción <3 kDa, obtenida mediante ultrafiltración, presentaron una mayor actividad inhibitoria de las enzimas DPP-IV y ECA, con respecto a la capacidad inhibitoria de los hidrolizados completos (Figura 10 y 11). Se observó que todos los hidrolizados, así como, en la fracción <3 kDa de los mismos, se presentó menores valores de IC_{50} ($p < 0.05$) en la inhibición de la actividad de la ECA con respecto a la inhibición de la enzima DPP-IV (Figura 10 y 11). Además, los hidrolizados de lactosuero con mayor capacidad inhibitoria de las enzimas DPP-IV y ECA corresponden al hidrolizado preparado con papaína, patrón que se observa de igual manera en la fracción < 3 kDa de los diferentes hidrolizados.

La fracción <3 kDa que presentó mayor inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA pertenece al hidrolizado con papaína con un IC_{50} de 0.233 y 0.038 mg/mL, respectivamente. La inhibición de la actividad de la ECA no presenta diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los diferentes hidrolizados (UF<3 kDa). Mientras que en la inhibición de la enzima DPP-IV, los hidrolizados producidos con papaína y trompillo fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) obteniéndose el menor IC_{50} para el hidrolizado obtenido con papaína.

El potencial que presentan las proteínas alimentarias para liberar péptidos con actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV, ha sido explorado (Lacroix y Li-Chan, 2012) y se ha reportado que los hidrolizados de proteínas del lactosuero producidos con el uso de enzimas digestivas, presentan la mayor actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV *in vitro* (Nongonierma y FitzGerald, 2013; Tulipano et al., 2011). Sin embargo, a la fecha no existen reportes donde proteasas de fuentes vegetales hayan sido evaluadas en la producción de péptidos con actividad inhibitoria de la DPP-IV. En este estudio el

hidrolizado con pepsina no presentó diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en la actividad inhibitoria de DPP-IV respecto a hidrolizados preparados con las diferentes preparaciones enzimáticas de origen vegetal, lo que indica que las proteasas vegetales evaluadas resultaron ser igualmente eficiente que la proteasa control (pepsina) para la producción de péptidos con capacidad inhibitoria de la DPP-IV a partir de las proteínas del lactosuero.

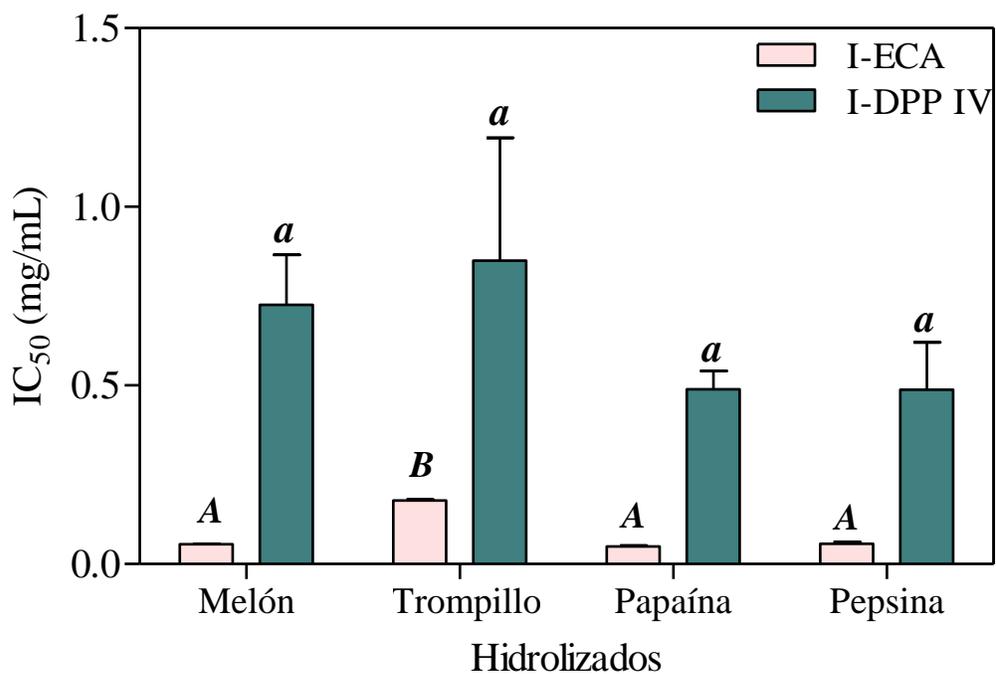


Figura 10. Inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA de los hidrolizados de lactosuero. Valores expresados como la concentración mínima requerida para inhibir en un 50 % (IC_{50}). (Concentración final en el ensayo). Valores de IC_{50} corresponden a la media de dos experimentos. Medias que no comparten literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Literales mayúsculas para I-ECA y minúsculas para I-DPP-IV.

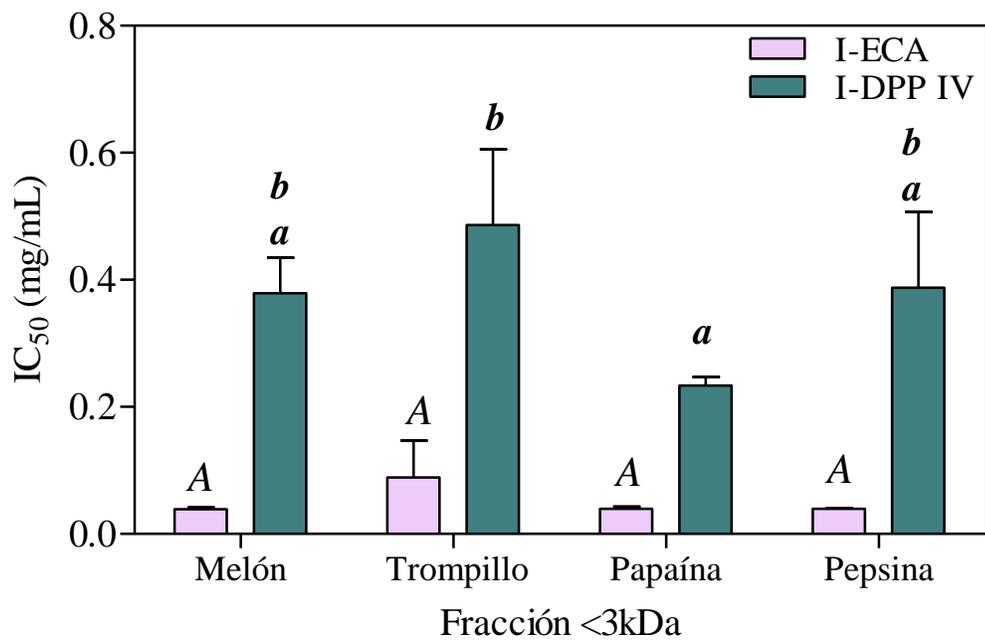


Figura 11. Inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA de las fracciones <3 kDa de hidrolizados de lactosuero. Valores expresados como la concentración mínima requerida para inhibir en un 50% (IC_{50}). (Concentración final en el ensayo). Valores de IC_{50} corresponden a la media de dos experimentos. Medias que no comparten literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Con la finalidad de identificar las fracciones cromatográfica más activas, se evaluó la actividad inhibitoria de ECA y DPP-IV de 4 fracciones cromatográfica obtenidas del UF <3 kDa preparados con las enzimas vegetales y pepsina (Figura 8 y 9). Se observó que ambas enzimas fueron inhibidas por las distintas fracciones. La F4 (fracción peptídica de menor tamaño molecular teórico), presentó mayor actividad inhibitoria para ambas enzimas, al mostrar valores de IC₅₀ más bajos de 0.029 y 0.007 mg/mL para DPP-IV y ECA, respectivamente. En la alta capacidad inhibitoria de la F4 influye el tamaño de los péptidos presentes en ella, ya que se ha demostrado que los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con mayor capacidad de inhibición están formados por 3 a 8 residuos (Morais et al., 2014), sin embargo, la naturaleza química del péptido es el elemento que define la capacidad de inhibición. No se observó un efecto significativo ($p \geq 0.05$) del tipo de enzima en las F1 y F2 para la actividad inhibitoria de DPP-IV; sin embargo, se observó que la capacidad inhibitoria de DPP-IV de la F3 y F4 fue menor para pepsina y papaína (menores valores de IC₅₀). Mientras que, para la capacidad inhibitoria de la ECA no se observó un efecto significativo ($p \geq 0.05$) del tipo de enzima en ninguna de las fracciones.

Los IC₅₀ (0.029 y 0.007 mg/mL) obtenidos en este estudio para la inhibición de la actividad DPP-IV y ECA, respectivamente, son menores a los reportados por Lacroix y colaboradores (2016) quienes reportan valores de IC₅₀ de 0.151mg/mL para la inhibición de DPP-IV y 0.059 mg/mL para la inhibición de ECA, los cuales corresponden a la fracción más activa obtenida por CEM de aislados de proteína de suero y α -La hidrolizados con enzimas de grado comercial. Esto demuestra que enzimas de origen vegetal (especialmente papaína) empleadas en la producción hidrolizados proteicos a partir de proteínas de lactosuero, liberan péptidos con igual o mayor capacidad inhibitoria de DPP-IV y ECA, en comparación con enzimas digestivas (i.e., pepsina) (Lacroix y Li-Chan, 2013). Por otro lado, con respecto a la inhibición de DPP-IV, los valores más bajos de IC₅₀ fueron de 0.029 y 0.036 mg/mL, muy parecido a lo reportado por Lacroix y Li-Chan, (2014a) quienes reportaron valores de IC₅₀ de 0.016 a 0.036 mg/mL en fracciones cromatográficas de hidrolizados de α -La.

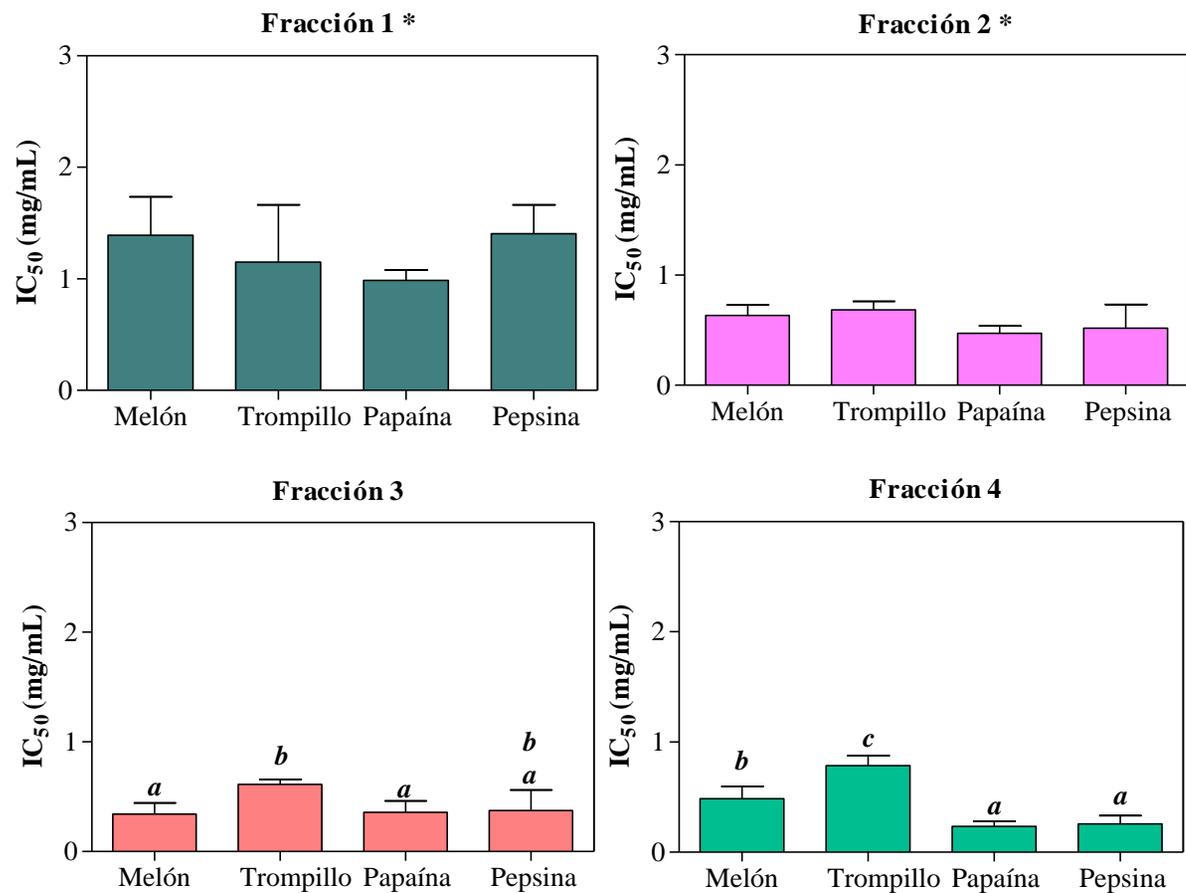


Figura 12. Inhibición de la enzima DPP-IV de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de hidrolizados proteicos. Los valores de IC₅₀ corresponden a la concentración mínima requerida (concentración final en el ensayo) para inhibir en un 50% la actividad de la enzima DPP-IV y corresponden a la media de tres experimentos. Medias que no comparten literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$). *No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la fracción de los diferentes hidrolizados.

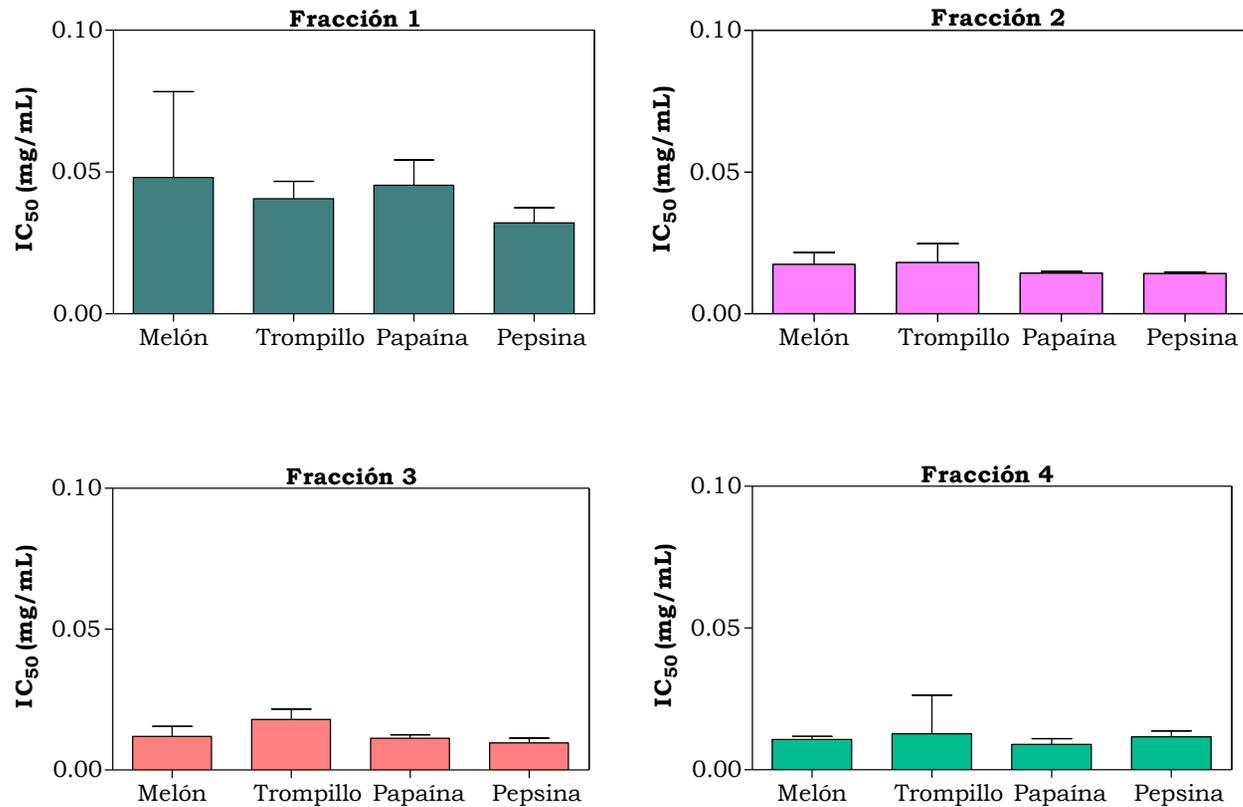


Figura 13. Inhibición de ECA de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de hidrolizados proteicos. Los valores de IC₅₀ corresponden a la concentración mínima requerida (concentración final en el ensayo) para inhibir en un 50% la actividad de la enzima ECA y corresponden a la media de tres experimentos. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro de una misma fracción obtenida de hidrolizados preparados con diferentes enzimas.

El análisis de varianza de dos vías (Tabla 7) de la capacidad inhibitoria de DPP-IV, nos muestra que al ser significativa la interacción entre el tipo de enzima y la fracción (tamaño del péptido), se debe al efecto que tiene el tipo de enzima en la generación de péptidos con diferente capacidad inhibitoria a partir de las proteínas del lactosuero. Por otro lado, el tipo de enzima utilizada y la interacción entre el tipo de enzima y la fracción no tuvieron un efecto significativo ($p \geq 0.05$) en la inhibición de la ECA, sin embargo, la capacidad inhibitoria de la fracción 1 es significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con las demás fracciones evaluadas.

Aunque la secuencia de aminoácidos que conforma el péptido sea el factor más importante que determine la capacidad inhibitoria sobre la actividad de DPP-IV y ECA (Lacroix et al., 2016), las secuencias específicas de los péptidos requeridos para causar la inhibición de la actividad de ECA son diferentes a las secuencias de los péptidos que inhiben la enzima DPP-IV, sin embargo un análisis posterior de secuenciación de los péptidos que se encuentran en las distintas fracciones permitiría dar soporte a dicha hipótesis.

Tabla 7. Efecto del tipo de enzima y fracción cromatográfica de los diferentes hidrolizados de lactosuero en la inhibición de la actividad de la enzima DPP-IV.

Factor de variación	GL	SC	CM	F	P
Tipo de Enzima	3	0.7515	0.2505	6.6	0.0008*
Fracción	3	7.0592	2.3530	61.9	0.0000*
Tipo de enzima * Fracción	9	0.8487	0.0943	2.48	0.0203*
Error	48	1.8225	3.7969E-2		

*Efecto significativo con $\alpha=0.05$

GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrado medio.

6.6 Correlación entre la Inhibición de las Enzimas DPP-IV y ECA de las Fracciones Peptídicas

La correlación o asociación entre la inhibición de la actividad de ECA y DPP-IV se muestra en la Figura 14, se puede observar que existe una fuerte asociación ($r=0.9588$) entre la inhibición de la actividad de ambas enzimas, este resultado concuerda por lo mostrado por Lacroix et al., (2016) y Neves et al., (2017), quienes reportaron que péptidos de diferentes fuentes proteicas han mostrado dual efecto inhibitorio de las enzimas DPP-IV y ECA. La fuerte asociación entre la inhibición de ambas enzimas, es resultado de la capacidad de las proteasas para generar secuencias peptídicas con capacidad de inhibir la actividad de ECA y DPP-IV. En general, los valores IC_{50} de inhibición de la ECA por los hidrolizados y las fracciones, son menores en comparación con los valores obtenidos para la inhibición de DPP-IV; observaciones similares fueron reportadas por Konrad et al., (2014) en fracciones obtenidas por RP-HPLC de hidrolizados de un concentrado de proteína de suero y β -Lactoglobulina preparados con una enzima aislada de calabaza asiática (*Cucurbita ficifolia*).

Se ha reportado que los péptidos inhibidores de la ECA contienen aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina), hidrofóbicos (prolina) o básicos (lisina o arginina) en la posición C-terminal (Morais et al., 2014) y que la mayoría de los péptidos inhibidores de DPP-IV contienen prolina y/o aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia. Dos de las secuencias ampliamente reportadas con alta capacidad inhibitoria de la ECA son Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) y Valina-Prolina-Prolina (VPP) (Bernard et al., 2005; Nongonierma y FitzGerald, 2015). Por otro lado, los tripéptidos Isoleucina-Prolina-Isoleucina (IPI) y Valina-Prolina-Leucina (VPL) son los péptidos con mayor capacidad inhibitoria de la enzima DPP-IV (Le Maux et al., 2016), por lo tanto, la similitud en la secuencia, así como los residuos de aminoácidos en ciertas posiciones de los péptidos inhibidores de ambas enzimas explicaría la asociación entre la inhibición de la actividad de las enzimas DPP-IV y ECA.

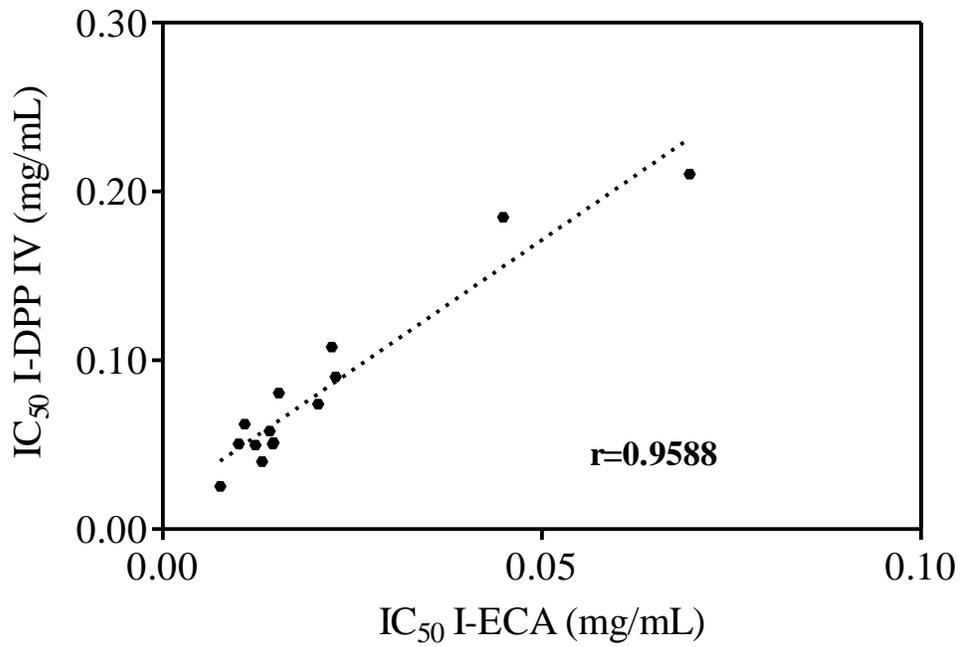


Figura 14. Correlación entre la inhibición de la actividad de la enzima DPP-IV y la ECA

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los hidrolizados proteicos de lactosuero producidos con enzimas proteolíticas de plantas liberan péptidos que presentan actividades inhibitorias de las enzimas DPP-IV y ECA.

El fraccionamiento con CEM de los hidrolizados, permitió identificar fracciones que presentan péptidos bifuncionales, ya que pueden inhibir a las enzimas relacionadas con la diabetes como DPP-IV y la hipertensión como ECA y que existe una correlación en los valores de IC_{50} para la inhibición de ambas enzimas.

Los hidrolizados generados a partir de proteínas de lactosuero por enzimas proteolíticas de origen vegetal, ofrecen potencial para la producción de péptidos con actividad antihipertensiva y antidiabética *in vitro* y su uso en la formulación de alimentos funcionales.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda la separación de las secuencias peptídicas por cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) y la identificación de los péptidos en espectrometría de masas, para tener una caracterización específica de los péptidos inhibidores de las enzimas DPP-IV y ECA que conforman dichas fracciones. Además, la evaluación *in vivo* de la capacidad inhibitoria de las enzimas DPP-IV y ECA de los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas, permitiría, determinar su estabilidad durante los procesos digestivos y confirmar su efecto benéfico a la salud. Por otro lado, el uso combinado de enzimas proteolíticas haría eficaz la liberación de péptidos y generaría una mayor diversidad de secuencias con potencial bioactivo.

9. REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. 1979 Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262.
- Ahrén, B. 2007. DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 517–533.
- Akal, C. 2017. Benefits of Whey Proteins on Human Health. In *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. 363–372.
- Alvarado Carrasco, C., y Guerra, M. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23(1), 42–49.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*. EUA
- Arruda, M. S., Silva, F. O., Egito, A. S., Silva, T. M. S., Lima-filho, J. L., Porto, A. L. F., y Moreira, K. A. 2012. LWT - Food Science and Technology New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 73–79.
- Ashwell, M. (2002). *Concepts of Functional Foods*. International Life Sciences Institute. Belgium.
- Baggio, L. L., y Drucker, D. J. 2007. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132(6), 2131–2157.
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. A., Mcconnell, M. A., y Carne, A. 2016. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chemistry*, 213, 98–107.
- Bernard, B. K., Nakamura, Y., Bando, I., & Mennear, J. H. 2005. Studies of the Toxicological Potential of Tripeptides (L-Valyl-L-prolyl-L-proline and L-Isoleucyl-L-prolyl-L-proline): II. Introduction. *International Journal of Toxicology*, 24(4_suppl), 5–11.
- Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., Colombo, M. L., Vairo Cavalli, S. E., & Bruno, M. A. 2015. Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 157–163.

Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., y Weber, P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11), 1202–1205.

Blaschek, K. M., Wendorff, W. L., y Rankin, S. A. 2007. Survey of Salty and Sweet Whey Composition from Various Cheese Plants in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 2029–2034.

Boland, M. 2011. Whey proteins. In *Handbook of Food Proteins* (pp. 30–55).

Boohaker, R. J., Lee, M. W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M., y Khaled, A. R. 2015. HHS Public Access, 19(22), 3794–3804.

Brown, N. J., & E, V. D. 1998. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, 14;97(14), 1411–1431.

Brown, L., Poudyal, H., y Panchal, S. K. 2015. Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obesity Reviews*, 16(11), 914–941.

Chávez-Garay, D. R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M. E., y García-Triana, A. 2016. Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CyTA - Journal of Food*, 14(2), 200–205.

Corrons, M. A., Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., López, L. M. I., y Bruno, M. A. 2012. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 103–109.

Corrons, M. A., Liggieri, C. S., Trejo, S. A., y Bruno, M. A. 2017. ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Research International*, 93, 8–15.

Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. 2017. Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32–53.

De Castro, R. J. S., y Sato, H. H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185–198.

ENSANUT MC 2016. Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>. Revisado en Julio 2018.

El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., y Salem, A. 2009. Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. *Food Reviews International*, 25(3), 251–270.

Feijoo-Siota, L., y Villa, T. G. 2011. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066–1088.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., y Walsh, D. J. 2004. Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S–988S.

Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5), 151–159.

Gajanan, P. G., y Elavarasan, K. 2016. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*.

Garske, A. L., Kapp, G., y McAuliffe, J. C. 2017. Industrial Enzymes and Biocatalysis. In *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* (pp. 1571–1638). Cham: Springer International Publishing.

Green, B. D., Flatt, P. R., & Bailey, C. J. 2006. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 3(3), 159–165.

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

Hernández-Ledesma, B., Contreras, M., y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.

Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., y Recio, I. 2014. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38(2), 82–100.

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., y Gómez-Ruiz, J. Á. 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101(1–3), 196–204.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., y Amigo, L. 2008. β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35(2), 257–265.

IDF. 2017. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas de la FID. Octava edición 2017*. Disponible en http://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_ES/. Revisado en Julio 2018.

INEGI. 2016. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>. Revisado en Julio de 2018.

Iwaniak, A., Darewicz, M., y Minkiewicz, P. 2018. Peptides Derived from Foods as Supportive Diet Components in the Prevention of Metabolic Syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 63–81.

Jao, C.-L., Hung, C.-C., Tung, Y.-S., Lin, P.-Y., Chen, M.-C., & Hsu, K.-C. 2015. The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes. *BioMedicine*, 5(3), 14.

Juillerat-Jeanneret, L. 2014. Dipeptidyl Peptidase IV and Its Inhibitors: Therapeutics for Type 2 Diabetes and What Else? *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(6), 2197–2212.

Kapel, R., Klingenberg, F., Framboisier, X., Dhulster, P., y Marc, I. 2011. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *Journal of Membrane Science*, 383(1–2), 26–34.

Katsanos, C. S., Chinkes, D. L., Paddon-Jones, D., Zhang, X., Aarsland, A., y Wolfe, R. R. 2008. Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. *Nutrition Research*, 28(10), 651–658.

Kilara, A., y Vaghela, M. N. 2018. Whey proteins. In *Proteins in Food Processing* (pp. 93–126). Elsevier.

Konrad, B., Anna, D., Marek, S., Marta, P., Aleksandra, Z., y Józefa, C. 2014. The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV, α -Glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(4), 483–491.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. 2007. Bioactive Peptides from Food Proteins. In *Handbook of Food Products Manufacturing* (pp. 1–37). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. 2012. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97–102.

Lacroix, I. M. E., y Li-Chan, E. C. Y. 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7500–7506.

Lacroix, I. M. E., y Li-Chan, E. C. Y. 2014a. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, 54, 39–48.

Lacroix, I. M. E., y Li-Chan, E. C. Y. 2014b. Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(1), 61–78.

Lacroix, I. M. E., y Li-Chan, E. C. Y. 2016. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation – Current knowledge and future research considerations. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 1–16.

Lacroix, I. M. E., Meng, G., Cheung, I. W. Y., y Li-Chan, E. C. Y. 2016. Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *Journal of Functional Foods*, 21, 87–96.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lavoie, J. L., y Sigmund, C. D. 2003. Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology*, 144(6), 2179–2183.

Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Barre, C., y Fitzgerald, R. J. 2016. Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*, 199, 246–251.

Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Lardeux, C., & FitzGerald, R. J. 2018. Impact of enzyme inactivation conditions during the generation of whey protein hydrolysates on their physicochemical and bioactive properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 219–227.

Li-jun, L., Chuan-he, Z., y Zheng, Z. 2008. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1), 1–6.

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. 2013. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163.

Luhovyy, B. L., Akhavan, T., y Anderson, G. H. 2007. Whey Proteins in the Regulation of Food Intake and Satiety. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(6), 704S–712S.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., y Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197–1211.

Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., y Malcata, F. X. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 437–455.

Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramírez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., y Vallejo-Cordoba, B. 2013. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 1902–1907.

Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., y Yada, R. Y. 2017. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(April), 1–17.

MBP. Medical Biochemistry Page. (1996-2018). Recuperado de: <https://themedicalbiochemistrypage.org/diabetes.php>

Mentlein, R. 2005. Therapeutic assessment of glucagon-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 14(1), 57–64.

Mignone, L. E. 2015. Whey protein: The “whey” forward for treatment of type 2 diabetes? *World Journal of Diabetes*, 6(14), 1274–1284.

Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. 2013. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. In *Food Industry*. InTech.

Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Amorim, L. L., Silva, V. D. M., Silva, M. R., Simões e Silva, A. C., y Silveira, J. N. 2014. Use of Different Proteases to Obtain Whey Protein Concentrate Hydrolysates with Inhibitory Activity toward Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), 102–109.

Moral, S., Ramírez-coutiño, L. P., García-gómez, M. D. J., Del Moral, S., P. Ramírez-Coutiño, L., & de Jesús García-Gómez, M. 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87–102.

Moreno-Hernández, J. M. (2013). Caracterización de la actividad coagulante y proteolítica de extractos de flor de naranjo (*Citrus aurantium l.*) y purificación parcial de una de sus proteasas (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo Sonora, México.

Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutin, A. V. 2000. Properties and Uses of Protein Hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452–459.

Neves, A. C., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., y FitzGerald, R. J. 2017. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 218, 396–405.

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. 2013. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal*, 32(1), 33–39.

Nongonierma, A. B., y Fitzgerald, R. J. 2014. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 165, 489–498.

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. 2015. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640–656.

OMS 2013. Organización Mundial de la Salud. Información general sobre la Hipertensión en el mundo. Día Mundial de la Salud 2013. Disponible en: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/es/. Revisado en Julio 2018.

OMS 2015. Organización Mundial de la Salud. Preguntas y respuestas sobre la hipertensión. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/82/es/> Revisado en Julio 2018

OMS 2018. World Health Organization. Global Health Observatory Map Gallery. Noncommunicable diseases. Date: 02/Feb/2018. Disponible en: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Revisado en Julio 2018.

Ó'Fágáin, C., y Colliton, K. 2017. Storage and Lyophilization of Pure Proteins (pp. 159–190).

Parish, R. C., y Miller, L. J. 1992. Adverse Effects of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. *Drug Safety*, 7(1), 14–31.

Parra Huertas, R. A. 2010. Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.

Patel, S. 2015. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308–319.

Patil, N. V, Janssen, A. E. M., y Boom, R. M. 2014. Separation of Whey Proteins using Cascaded Ultrafiltration. *Separation Science and Technology*, 49(15), 2280–2288.

Paul, M., Poyan Mehr, A., y Kreutz, R. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*, 86(3), 747–803.

Peram, M. R., Loveday, S. M., Ye, A., y Singh, H. 2013. In vitro gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 63–74.

Perez Espitia, P. J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Souza Cruz, R., y Alves Medeiros, E. A. 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 187–204.

Pe-Leppala, A., Koskien, P., Piilola, K., Tupasela, T., y Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), S0022029999003982.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., y Korhonen, H. 1998. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325–331.

Pravst, I. 2012. Functional Foods in Europe: A Focus on Health Claims. In B. Valdez (Ed.), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (InTech, p. 45). Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/scientific-health-and-social-aspects-of-the-food-industry/functional-foods-ineurope-a-focus-on-health-claims>

Puig-Domingo, M., y Pellitero, S. 2015. Nuevos agentes terapéuticos para la diabetes tipo 2. *Medicina Clinica*, 144(12), 560–565.

Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., y Malcata, F. X. 2016. Whey and Whey Powders: Production and Uses. *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd.

Reddy, I. M., Kella, N. K. D., y Kinsella, J. E. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of beta-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(4), 737–741.

Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Jiménez-Corona, A., Gómez-Pérez, F. J., Barquera, S., y Lazcano-Ponce, E. 2012. Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Pública de México*, 54(1), 7–12.

Román-Vargas, J., Vázquez-Martínez, V., Loera-Morales, J., Cantú-Solis, O., Cervantes-Vázquez, D., & Bernabé-Adame, C. 2016. Panorama epidemiológico del paciente con hipertensión arterial sistémica no controlada en una unidad de medicina familiar de Reynosa, Tamaulipas. *Atención Familiar*, 23(1), 14–18.

Savarese, G., Lund, L. H., y Rosano, G. M. C. 2017. Incretin-based therapy for type 2 diabetes: A real class effect? *International Journal of Cardiology*, 227, 141–142.

Silveira, S. T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., y Hernández-Ledesma, B. 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in beta-lactoglobulin. *Food Chemistry*, 141(2), 1072–1077.

Smithers, G. W. 2008. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704.

Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., y FitzGerald, R. J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453.

Stevenson, E. J., y Allerton, D. M. 2018. The role of whey protein in postprandial glycaemic control. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(01), 42–51.

Su, G., Ren, J., Zhao, M., & Sun, D.-W. (2013). Comparison of Superdex Peptide HR 10/30 Column and TSK Gel G2000 SWXL Column for Molecular Weight Distribution Analysis of Protein Hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3620–3626.

Tahrani, A. A., Bailey, C. J., Del Prato, S., y Barnett, A. H. 2011. Management of type 2 diabetes: M new and future developments in treatment. *The Lancet*, 378(9786), 182–197.

Tavano, O. L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11.

Tavares, T. G., Monteiro, K. M., Possenti, A., Pintado, M. E., Carvalho, J. E., y Malcata, F. X. 2011. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 21(12), 934–939.

Tavares, T. G., Spindola, H., Longato, G., Pintado, M. E., Carvalho, J. E., y Malcata, F. X. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of novel dietary protein hydrolysate produced from whey by proteases of *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 32(2), 156–162.

Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.-C., & Mora, L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404.

Tulipano, G., Sibilía, V., Maria, A., & Cocchi, D. 2011. Peptides Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, 32(4), 835–838.

Tulipano, G., Faggi, L., Nardone, A., Cocchi, D., y Maria, A. 2015. Characterisation of the potential of β -lactoglobulin and α -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: *In silico* and *in vitro* comparative studies. *International Dairy Journal*, 48, 66–72.

Uchida, M., Ohshiba, Y., y Mogami, O. 2011. Novel Dipeptidyl Peptidase-4-Inhibiting Peptide Derived from β -Lactoglobulin. *Journal of Pharmacological Sciences*, 117(1), 63–66.

Weder, J. K. P., y Belitz, H.-D. 2003. PROTEIN | Functional Properties. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (pp. 4835–4841). Elsevier.

White, W. B., Bresalier, R., Kaplan, A. P., Palmer, B. F., Riddell, R. H., Lesogor, A., Keefe, D. L. 2010. Safety and Tolerability of the Direct Renin Inhibitor Aliskiren: A Pooled Analysis of Clinical Experience in More Than 12,000 Patients With Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 12(10), 765–775.

Wu, J., Aluko, R. E., y Muir, A. D. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950(1–2), 125–130.

Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., y Surampalli, R. Y. 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756–774.

Zhang, Y., Chen, R., Zuo, F., Ma, H., Zhang, Y., y Chen, S. 2016. Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by *in silico* and *in vitro* analyses. *International Dairy Journal*, 53, 37–44.

Zheng, X. Q., Li, L. Te, Liu, X. L., Wang, X. J., Lin, J., y Li, D. 2006. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4), 763–770.