



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

**AISLAMIENTO DE PÉPTIDOS POTENCIALMENTE  
ANTIHIPERTENSIVOS Y ANTIOXIDANTES A PARTIR DE  
HIDROLIZADOS DE SUBPRODUCTOS DE SARDINA  
MONTEREY (*Sardinops sagax caerulea*)**

---

Por:

Aristeo Villalobos Rodríguez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

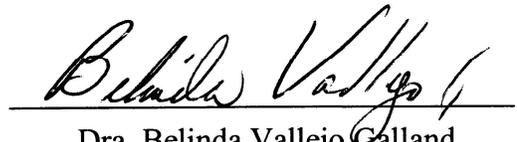
MAESTRÍA EN CIENCIAS

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Aristeo Villalobos Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría en Ciencias de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez  
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland  
Asesor



M.C. María Elena Lugo Sánchez  
Asesor



Dr. Rogério Sotelo Mundo  
Asesor



Dr. Miguel Angel Mazorra Manzano  
Asesor



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
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 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, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo otorgado para efectuar mis estudios de maestría.

Con profundo agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD); en especial a la CTAOA, por permitirme formar parte de sus estudiantes de posgrado y por permitirme efectuar con éxito este trabajo.

A la industria enlatadora Productos Pesqueros de Guaymas (Propeguay) S.A. de C.V., la cual contribuyó con la donación de la muestra (cabezas y colas de sardina Monterey) y la enzima *Protex 6L*<sup>®</sup>. Sin estas donaciones, no hubiera sido posible el desarrollo del presente trabajo.

A mi alma mater, la Universidad de Sonora (UNISON), por ser uno de los pilares y generadores base de mis conocimientos, los cuales me permitieron efectuar con éxito mis estudios de posgrado.

A la Coordinación de Programas Académicos del CIAD, por la beca otorgada para finalizar mi trabajo de tesis de maestría. Sinceramente, ¡muchas gracias!

Al Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, por haberme confiado de nueva cuenta uno de sus proyectos de gran importancia para el desarrollo de la presente investigación. Muchas gracias por todo su apoyo, por su paciencia y por la confianza que siempre me tuvo desde que inicié como su tesista de licenciatura. Mi eterno agradecimiento por permitirme ser parte del laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros y no sólo realizar mi tesis de maestría, sino también, darme la oportunidad de colaborar en varios proyectos que se están o que se llevaron a cabo en dicho laboratorio. Lo anterior me permitió conocer y aprender diversas técnicas, así como el manejo de varios equipos de laboratorio.

A la maestra María Elena Lugo Sánchez (Mels), por formar parte de mi comité de tesis y por su amistad brindada desde que formé parte del área de Productos

Pesqueros. No sólo fue una excelente asesora, sino una excelente persona, una gran amiga, ya que académicamente aprendí muchas cosas a su lado, pero también me brindó su apoyo en muchos momentos y me aconsejó en ciertos temas de la vida. Por su amistad incondicional, ¡muchas gracias!.

Al Dr. Miguel Ángel Mazorra, Dra. Belinda Vallejo, Dr. Rogerio Sotelo y Dr. Ramón Pacheco, gracias por formar parte de mi comité de tesis. Sus comentarios y sugerencias durante los seminarios fueron de mucha ayuda para el desarrollo con éxito de mi trabajo de tesis. Así como sus correcciones llevadas a cabo durante la revisión del presente escrito.

Al personal del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros: M.C. Gisela Carvallo Ruiz, M.C. Guillermina García Sánchez, M.C. María Elena Lugo Sánchez, Dra. Celia García Sifuentes, Dra. Susana Scheuren Acevedo, Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, Dr. Ramón Pacheco Aguilar, Dra. Teresa Gollas y Dr. Martínez Porchas, muchas gracias por permitirme formar parte de un laboratorio en el cual el trabajo se hace muy ameno y por su apoyo en el transcurso de mis estudios de posgrado. Los consejos de cada uno me han servido para superarme día a día. En especial, quiero agradecer el apoyo técnico brindado por parte de la M.C. Gisela Carvallo Ruiz, por su colaboración durante los muestreos.

A mis compañeros, excompañeros y amigos del área de Productos Pesqueros: Carmen Cecilia Espinoza, Marco Antonio Sántiz, Vida Mariel López, Wilfrido Torres (Willy), Ana Gloria Villalba, Enrique Márquez, Gabriel Fuente, Verónica Peralta, Marisol García, Wendy Lizárraga, Jazmín Sánchez, Brenda Encinas, Raúl Avilés, Josué López, Nidia Valenzuela, Carla Ogarrio, Nayeli Gallardo, Dolores Figueroa, Iliana Acuña, Hugo Ramírez, Carlos Sotelo, Aarón Salazar y Julio López. Gracias por todo su apoyo, sus consejos, por su gran amistad y por los buenos momentos que compartimos juntos. En especial a I.B. Julio López Romero, Nayeli Gallardo Melesio, Carla Ogarrio León, M.C. Nidia Valenzuela Grijalva y Josué López Cerón, muchas gracias por el apoyo técnico brindado en la primera etapa del experimental de mi tesis de maestría. A todos los que colaboraron directamente e indirectamente durante mi etapa experimental, ¡muchas gracias!

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de Productos Cárnicos y de Productos Lácteos. De manera especial a Yair Paco Ramírez y Eleazar Aguilar Toalá por su apoyo técnico brindado en la presente investigación, mediante sus asesorías técnicas en el uso del lector de microplacas de ELISA.

A la Dra. Yolanda López Franco y a la M.C. Karla Martínez Robinson, personal del laboratorio de Biopolímeros, por las facilidades dadas en el uso liofilizador que se encuentra en su laboratorio y por permitirnos hacer uso de su fraccionador marca Bio-Rad en el laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros.

## DEDICATORIA

*A mis padres Aristeo y María Candelaria, con gran admiración, respeto y cariño profundo. Gracias por ser mis guías en el camino de la vida, por enseñarme a ser una persona responsable, de buenos principios. No existe un amor tan grande como el de aquellos padres que deciden concebir un hijo, un hijo al cual proteger y velar por su bien durante todo el transcurso de su vida. Por eso y más, mi eterna gratitud a ustedes mis queridos padres.*

*A mis hermanas Dania Yaritza y Gisela Margarita, de las cuales he recibido siempre su apoyo y han sido un estímulo para seguir siempre adelante en mi vida. Un buen hermano es aquel amigo que nunca te abandona, que te brinda su apoyo sin esperar algo a cambio y que comparte contigo no sólo los buenos momentos de la vida, sino también los malos para superarlos juntos.*

*A mis abuelas María Concepción y Rosa Navarro, a quienes agradezco por la educación que les brindaron a mis padres y la cual me heredaron. No hay mejor fruto que una buena enseñanza durante la infancia y la juventud. ¡Muchas gracias mis queridas abuelas!*

*A Carmen Cecilia, mi personita especial, quien ha compartido conmigo momentos muy agradables y me ha apoyado en todo desde el momento que decidió formar parte de mi destino. Quien me regala una sonrisa, me regala felicidad. Gracias por esos días en los que no ha faltado una sonrisa tuya.*

*A todos mis amigos que han sido una parte esencial en mi vida, por su amistad y apoyo incondicional.*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE TABLA</b> .....	xv
<b>RESUMEN</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	3
Sardina Monterey como Recurso Pesquero.....	3
Subproductos Generados del Procesamiento de Productos Pesqueros como Fuentes Pontenciales de Compuestos de Alto Valor.....	4
Péptidos Bioactivos a partir de Productos y Subproductos Pesqueros.....	6
Producción de Péptidos Bioactivos.....	7
Fermentación microbiana.....	7
Hidrólisis enzimática y métodos para su evaluación.....	8
Fraccionación y Purificación de Péptidos.....	12
Ultrafiltración.....	12
Cromatografía de filtración en gel.....	12
HPLC-fase reversa.....	12
Biodisponibilidad de los Péptidos Bioactivos.....	13

Propiedades Biológicas de Péptidos.....	14
Actividad antihipertensiva.....	14
Compuestos inhibidores de ECA.....	17
Evaluación de la actividad inhibitoria de ECA.....	21
Actividad antioxidante.....	22
Compuestos con propiedades antioxidantes.....	23
Métodos para la evaluación de actividad antioxidante...	26
Otras propiedades bioactivas.....	27
<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
Materia Prima.....	31
Producción del Homogenado de los Subproductos de Sardina Monterey.....	31
Análisis Químico.....	32
Selección de Condiciones de Hidrólisis.....	32
Evaluación del Grado de Hidrólisis.....	33
Análisis de Proteínas en Geles de SDS-Poliacrilamida.....	33
Producción de Hidrolizados.....	34
Fraccionación de los Hidrolizados.....	35
Purificación de Péptidos por HPLC-Fase Reversa.....	35

Determinación de Actividad Antihipertensiva mediante la Actividad Inhibitoria de ECA.....	36
Determinación de Actividad Antioxidante mediante el Ensayo de Captación de Radicales DPPH.....	37
Análisis Estadístico.....	38
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
Caracterización de la Materia Prima.....	39
Efecto del Tipo de Proteasa sobre el Grado de Hidrólisis.....	41
Efecto del Tipo de Proteasa sobre la Degradación de Proteínas.....	46
Actividad Antihipertensiva en Fracciones obtenidas por Ultrafiltración.....	50
Actividad Antihipertensiva de Fracciones Purificadas por HPLC-Fase Reversa.....	54
Actividad Antioxidante en Fracciones obtenidas por Ultrafiltración.....	59
Actividad Antioxidante de Fracciones Purificadas por HPLC-Fase Reversa	63
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Sistema regulador de la presión arterial (renina-angiotensina).....	16
<b>Figura 2.</b> Correlación de las 3 últimas posiciones del extremo C-terminal en peptidos inhibidores de ECA y las subunidades del sitio activo de la ECA.....	20
<b>Figura 3.</b> Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) con <i>Protex 6L</i> <sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240 y 360 min).....	42
<b>Figura 4.</b> Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) con <i>Alcalasa 2.4L</i> <sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240 y 360 min).....	43
<b>Figura 5.</b> Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) con <i>Flavourzyme</i> <sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240 y 360 min).....	44
<b>Figura 6.</b> Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) durante la hidrolisis con <i>Protex 6L</i> <sup>®</sup> , a diferentes	

tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE).....	47
<b>Figura 7.</b> Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) durante la hidrólisis con <i>Alcalasa 2.4L</i> <sup>®</sup> , a diferentes tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE).....	48
<b>Figura 8.</b> Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) durante la hidrólisis con <i>Flavourzyme</i> <sup>®</sup> , a diferentes tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE).....	49
<b>Figura 9.</b> Actividad inhibitoria de ECA de fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, posteriormente liofilizadas y ajustadas a una concentración de 0.5 mg de NNP/mL.....	51
<b>Figura 10.</b> Valores de IC <sub>50</sub> correspondientes a la concentración necesaria de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, para inhibir al 50% la actividad de la ECA.....	53
<b>Figura 11.</b> Patrón de elusión por HPLC-fase reversa de la fracción <1 kDa del hidrolizado producido con <i>Alcalasa 2.4L</i> <sup>®</sup> (8% GH).....	55
<b>Figura 12.</b> Actividad inhibitoria de ECA de fracciones peptídicas obtenidas por HPLC-fase reversa.....	56
<b>Figura 13.</b> Valores de IC <sub>50</sub> correspondientes a la concentración necesaria de las fracciones obtenidas por HPLC-fase reversa, para inhibir al 50% la actividad de la ECA.....	57

<b>Figura 14.</b> Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, liofilizadas y evaluadas a una concentración de 5 mg de NNP/mL.....	60
<b>Figura 15.</b> Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, posteriormente liofilizadas y evaluadas a diferentes concentraciones.....	61
<b>Figura 16.</b> Patrón de elusión por HPLC-fase reversa de la fracción 1-5 kDa del hidrolizado producido con <i>Protex 6L</i> <sup>®</sup> (6% GH).....	64
<b>Figura 17.</b> Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas por HPLC-fase reversa.....	65

## ÍNDICE DE TABLA

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición química del macerado de subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> ) obtenido en los diferentes muestreos.....	40

## RESUMEN

La captura de sardina es una pesquería importante en la región Noroeste de la República Mexicana, ocupando Sonora el primer lugar de captura a nivel nacional. El enlatado de sardina es una actividad industrial importante y los subproductos generados durante este proceso poseen un alto contenido de proteína, los cuales, con el fin de ser aprovechados se destinan a la producción de harina de pescado; sin embargo, estos podrían ser tratados tecnológicamente para obtener péptidos con actividad biológica (antihipertensiva y antioxidante) para dar un valor agregado a los mismos. Así, el objetivo del presente trabajo fue producir y aislar péptidos potencialmente antihipertensivos y antioxidantes, generados a partir de la hidrólisis proteica de subproductos (cabezas y colas) provenientes del enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). Se estudiaron factores como tipo de proteasa (*Flavourzyme*<sup>®</sup>, *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup>) y tiempo de reacción (30, 60, 120, 240 y 360 min) sobre la hidrólisis de homogenados de subproductos. Se evaluó el perfil electroforético durante la hidrólisis y monitoreó el grado de hidrólisis (GH) mediante la cuantificación de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 10%. Los valores más altos de GH resultaron para los hidrolizados producidos con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup> con 8.1% y 8.4%, respectivamente. Se colectaron fracciones <1 y de 1-5 kDa por ultrafiltración, las cuales fueron liofilizadas para su posterior evaluación, *in vitro*, de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y actividad de captación de radicales DPPH. Todas las fracciones peptídicas recolectadas exhibieron ambas propiedades. Sin embargo, la fracción <1 kDa obtenida con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (8% de GH) exhibió la más alta actividad inhibitoria de ECA y por ende el menor IC<sub>50</sub> (0.2 ± 0.0 mg de NNP/mL). Por otro lado, la fracción 1-5 kDa generada con *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% de GH) expresó la más alta actividad de captación de radicales DPPH (72.8 ± 0.3%, a 10 mg de NNP/mL). Subsecuentemente, estas dos fracciones fueron fraccionadas por HPLC-fase reversa.

Ocho subfracciones fueron aisladas de la fracción <1 kDa, y 4 de ellas mostraron bajos valores de IC<sub>50</sub>, en el rango de 0.4 - 0.5 mg/mL. Con respecto a la fracción de 1-5 kDa, 12 subfracciones fueron aisladas mostrando una de ellas el más alto porcentaje de captación de radicales DPPH, correspondiendo a un valor de 30.0 ± 0.4% a una concentración de 1.1 mg/mL. Los resultados arrojados en la presente investigación indican que los subproductos generados durante el enlatado de sardina Monterey (colas y cabezas) tienen el potencial para ser utilizados como materia prima para la producción de hidrolizados proteicos con actividad antioxidante y antihipertensiva, mediante la aplicación de tecnología convencional.

**Palabras clave:** Subproductos de sardina Monterey, enzima convertidora de angiotensina, actividad antioxidante, hidrolizados proteicos.

## ABSTRACT

Sardine catch is an important fishery in Northwest Mexico, where Sonora leads the national catch. Sardine canning industry is an important activity whose by-products have high protein content and are commonly used for fish meal production; however, these by-products can also be treated technologically to obtain bioactive peptides (antihypertensive and antioxidant), action that could add value to these by-products. Thus, the objective of the present study was to produce and isolate potentially antihypertensive and antioxidant peptides generated from by-products (heads and tails) protein hydrolysis from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) canning. Factors such as type of protease (*Flavourzyme*<sup>®</sup>, *Alcalase 2.4L*<sup>®</sup> and *Protex 6L*<sup>®</sup>) and reaction time (30, 60, 120, 240 and 360 min) on by-products homogenates hydrolysis were studied. Electrophoretic profile during hydrolysis was evaluated, and the degree of hydrolysis (DH) was monitored by quantification of soluble nitrogen in 10% trichloroacetic acid. The highest DH was produced with *Alcalase 2.4L*<sup>®</sup> and *Protex 6L*<sup>®</sup> with 8.1 and 8.4%, respectively. Fractions (<1 and 1-5 kDa) were collected by ultrafiltration and then lyophilized for further *in vitro* evaluation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and DPPH radical-scavenging activity. All peptide fractions collected exhibited both properties. Nevertheless, <1 kDa fraction obtained with *Alcalase 2.4L*<sup>®</sup> (8% DH) exhibited the highest ACE inhibitory activity and hence the lowest IC<sub>50</sub> value (0.2 ± 0.0 mg of NPN/mL). On the other hand, the 1-5 kDa fraction generated with *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% DH) expressed the highest DPPH radical-scavenging activity (72.8 ± 0.3%, 10 mg of NPN/mL). Subsequently, these fractions were fractionated by HPLC-reverse phase, isolating eight subfractions from the <1 kDa fraction (with 4 of these showing low IC<sub>50</sub> values, in the range of 0.4 to 0.5 mg/mL), while twelve subfractions from the 1-5 kDa fraction were isolated with only one showing the highest percentage of DPPH radical-scavenging (30.0 ± 0.4% at a

concentration of 1.1 mg/mL). Results indicate that Monterey sardine canning by-products (tails and heads) have the potential to be used as raw material for the production of protein hydrolysates with antihypertensive and antioxidant activity, by application of conventional technology.

**Keywords:** Monterey sardine by-products, angiotensin I converting enzyme, antioxidant activity, protein hydrolysates.

## INTRODUCCIÓN

La pesquería de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es la más importante en la región Noroeste de México, de la cual el Estado de Sonora aporta alrededor del 56% de la producción nacional (CONAPESCA, 2011). Su consumo humano directo, ya sea fresca o enlatada, representa alrededor del 41% (principalmente enlatada), mientras que el 59% restante se destina para la elaboración de harina de pescado para consumo animal (CONAPESCA, 2011).

La porción comestible de sardina que se aprovecha para consumo humano directo en forma de filete o utilizada para el enlatado, representa aproximadamente entre el 40-45% (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000), mientras que el 55-60% restante (cabeza, cola y vísceras) se somete a reducción para la elaboración de harina de pescado. Los subproductos de este proceso los cuales, con el fin de aprovecharlos y explotarlos, pueden ser tratados por tecnologías nuevas o existentes para obtener co-productos de valor agregado (Castillo-Yáñez *et al.*, 2004), ya que estos poseen un alto contenido de proteína (alrededor del 10% base húmeda) (Ramirez-Suarez *et al.*, 2010). La hidrólisis de proteínas para la producción de péptidos con actividad biológica, puede ser una alternativa tecnológica viable para dar valor agregado a estos subproductos. Estos péptidos bajo peso molecular, se pueden obtener mediante el uso de enzimas proteolíticas (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2001; Kitts y Weiler, 2003), procesos fermentativos (Yamamoto *et al.*, 1999; Gobbetti *et al.*, 2002) o por la combinación de ambas tecnologías (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1998). Con la ayuda de estos procesos, se han obtenido diversos péptidos con actividad biológica a partir de diferentes fuentes proteicas de origen marino (algas, músculo, vísceras, aguas de cocción y piel de pescado). Destacando entre estos, los péptidos con actividad potencialmente antihipertensiva (Bougatef *et al.*, 2008; Ramirez-Suarez *et al.*, 2010) y actividad potencialmente antioxidante (Mendis *et al.* 2005; Bougatef *et al.*, 2010).

Los péptidos con actividad antihipertensiva, como su nombre lo indica, son eficaces para el control de la hipertensión arterial, ya que actúan inhibiendo la acción de la enzima convertidora de angiotensina, una de las enzimas involucradas en la regulación de la presión sanguínea (sistema renina-angiotensina-aldosterona). La hipertensión arterial es considerada uno de los factores de riesgo más importantes dentro de las enfermedades cardiovasculares y cerca de 1 billón de adultos en el mundo padece esta enfermedad (Kearney *et al.*, 2005), por lo que el uso de péptidos bioactivos para el control de la presión arterial es de gran relevancia.

Por otro lado, péptidos con propiedades antioxidantes podrían ser utilizados por la industria alimentaria para inhibir y/o reducir el desarrollo de sabores indeseables, olores desagradables y la generación de compuestos químicos potencialmente tóxicos provenientes de la oxidación de lípidos. Hasta hoy, la industria alimentaria ha utilizado algunos compuestos antioxidantes sintéticos como aditivos alimentarios bajo estrictas regulaciones debido a que son un riesgo potencial para la salud (Ito *et al.*, 1986). Es por ello que actualmente ha aumentado el interés por identificar compuestos con propiedades antioxidantes y su aislamiento a partir de fuentes naturales.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue producir y aislar péptidos potencialmente antihipertensivos y antioxidantes, generados a partir de la hidrólisis proteica de un homogenado de subproductos (cabezas y colas) del proceso de enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

## ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### Sardina Monterey como Recurso Pesquero

La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) también llamada sardina del Pacífico, es una especie que pertenece a la familia Clupeidae. Es un pequeño pez teleosteo, pelágico, plateado con una aleta dorsal que se localiza sobre el centro del cuerpo, una aleta caudal partida en dos y largas escamas espinosas en el abdomen. Es un organismo omnívoro filtrador que se alimenta de crustáceos zooplanctónicos, moluscos pterópodos, y en menor medida de fitoplancton (DFO, 2004). Es un pez pelágico que forma densos cardúmenes y realiza migración estacional de desove en el Golfo de California. Su talla comercial oscila entre los 13 y 30 cm de longitud desde la punta del hocico hasta la base de la aleta caudal; sin embargo, la talla promedio de los organismos capturados va de 14 a 20 cm de longitud (Doode, 1992). Además, como consumidor del nivel primario de la cadena trófica, tiene un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas marinos y es presa de otros animales en esta cadena (Martínez-Porchas *et al.*, 2009).

En el hemisferio norte, la sardina Monterey se distribuye desde la costa del sureste de Alaska a la costa noroeste de México, incluyendo el Golfo de California y, en el hemisferio sur, desde el sur de Ecuador hasta el norte de Chile (Galindo-Cortes *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011).

La sardina es una de las pesquerías más abundantes y un recurso importante para la industria pesquera de la República Mexicana, la cual representó en el 2011, alrededor del 41% de la captura total de peces en México. La mayor parte de su captura se realiza en el Golfo de California, destacando el Estado de Sonora con casi el 60% de la producción pesquera nacional (CONAPESCA, 2011). En Sonora, la captura de sardina

ocupa el primer lugar de las pesquerías realizadas, siendo Guaymas y Yavaros los principales puertos sardineros (SAGARPA, 2004). Su producción a nivel nacional ha fluctuado entre los 488,837 y 872,640 toneladas en los últimos 9 años; obteniéndose para el 2011 una producción de 684,132 toneladas (CONAPESCA, 2011).

La sardina es un recurso pesquero de alta disponibilidad, de bajo costo antes y después de procesada. Es una de las fuentes de proteína de alta calidad más importantes y baratas para el consumo humano, con abundantes ácidos grasos  $\omega$ -3; sin embargo, su consumo es muy bajo y se da exclusivamente en forma de producto enlatado (Villegas, 1996).

Los principales procesos de transformación de la sardina son el enlatado para el consumo humano directo y la reducción para la fabricación de harina de pescado destinada a la alimentación animal, siendo este último un ingrediente proteico importante en la dieta de los animales de granja. En Sonora, la captura de sardina se procesa básicamente en tres formas: harina de pescado (59%), enlatado y congelado (41%) (Doode, 1992; CONAPESCA, 2011).

#### Subproductos Generados del Procesamiento de Productos Pesqueros como Fuentes Potenciales de Compuestos de Alto Valor

Los subproductos del procesamiento de pescado, los cuales incluyen cabezas, colas, huesos, aletas, pieles, vísceras y algunos recortes, son residuos generados después del fileteado del pescado y son considerados recursos de escaso valor económico. Estos, dependiendo de sus características y con la finalidad de darles un valor en el mercado, se utilizan para producir harina de pescado, músculo picado ó molido, fertilizantes, alimentos para mascotas y ensilados de pescado (Kim y Mendis, 2006; Klompong *et al.*, 2007; Arason *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2011). Se estima que los subproductos pesqueros pueden llegar a representar aproximadamente tres cuartas partes del total del peso de la captura (Shahidi, 1994; Pastoriza *et al.*, 2004), esto dependiendo de la especie. Además, se estima que a nivel mundial, se generan aproximadamente 20 millones de toneladas de residuos o subproductos en la industria pesquera y acuícola al

año (Wilson *et al.*, 2011). Por lo tanto, existe un gran potencial en las industrias procesadoras para utilizar los subproductos generados del procesamiento de producto marino, ya que estos contienen compuestos de alto valor, tales como proteínas (algunas enzimas, colágeno y gelatina, entre otras), lípidos (ácidos grasos poliinsaturados esenciales de las familias de los omega), péptidos, y minerales solubles en agua, que pueden ser recuperados para generar productos de valor agregado (Kim y Mendis, 2006; Arason *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2011). El utilizar los residuos o subproductos generados durante el procesamiento de pescados es muy importante para la industria pesquera, ya que le puede generar ingresos económicos, además de recuperar componentes de alto valor nutricional incrementan el rendimiento de la materia prima durante el procesamiento. En algunos casos, el producto de valor agregado generado puede llegar a tener mayor valor económico que el propio filete de pescado comercializado (Arason *et al.*, 2009; Muzaifa *et al.*, 2012).

Los compuestos bioactivos podrían ser extraídos y purificados empleando diferente tipo de tecnología, desde la básica (por ejemplo centrifugación) hasta alguna más sofisticada (ultrafiltración, liofilización). El desarrollo de nuevas tecnologías ó procesos para extraer nuevos compuestos bioactivos a partir de los subproductos del procesamiento de organismos pesqueros, puede generar valor a lo que hoy se considera un residuo o desecho de la industria procesadora de organismos acuáticos (Kim y Mendis, 2006; Arason *et al.*, 2009). Diversos estudios han identificado una serie de compuestos bioactivos a partir de subproductos del procesamiento de organismos marinos (Kim *et al.*, 2001; Jeon y Kim, 2002; Je *et al.*, 2005).

El uso de procesos hidrolíticos para la conversión de subproductos pesqueros en productos de alto valor, comercializables, son tecnologías adecuadas y de gran aceptación. Estos hidrolizados pueden ser utilizados en la formulación de alimentos para consumo humano como ingredientes funcionales y no solo para consumo animal ó fertilizantes (Klompong *et al.*, 2007).

## Péptidos Bioactivos a partir de Productos y Subproductos Pesqueros

Los péptidos bioactivos, ó con actividad biológica, son secuencias de aminoácidos de entre 2 a 20 residuos de aminoácidos, con pesos moleculares <6 kDa. Estos se encuentran inactivos dentro de la estructura primaria de la proteína intacta, pudiendo ser “liberados y activados” tras la hidrólisis de la proteína a través de la digestión gastrointestinal, procesamiento del alimento ó mediante fermentación. Los péptidos liberados, más allá de ser una fuente de energía metabólica y de aminoácidos esenciales (necesarios para el crecimiento y mantenimiento de las funciones fisiológicas), pueden ejercer diversos efectos benéficos adicionales en el organismo, ya que poseen actividad similar a la de hormonas (Korhonen y Pihlanto, 2006; Vioque *et al.*, 2006; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Sarmadi e Ismail, 2010). En la última década se han identificado péptidos que actúan en el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico, endocrino y nervioso (Kitts y Weiler, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006). Además, se sabe que un péptido puede ejercer no sólo una función, sino diversas funciones *in vivo* dependiendo de su peso molecular, estructura, composición y secuencia de aminoácidos (Iwaniak y Minkiewicz, 2007).

Estos péptidos tienen el potencial de promover la salud humana al reducir el riesgo de enfermedades crónicas, trastornos metabólicos, además de potenciar al sistema inmune natural. Por lo tanto, pueden formar parte de preparaciones farmacológicas con un efecto benéfico bien definido (Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2003).

Los péptidos bioactivos, debido a su procedencia natural, son considerados más seguros en comparación a los fármacos o aditivos alimentarios sintéticos, ya que pueden ser absorbidos fácilmente (Lee *et al.*, 2010). Además, son considerados compuestos de alto valor, tanto económico, nutricional y ambiental, por la industria procesadora de organismos acuáticos (Arason *et al.*, 2009).

Los hidrolizados proteicos de pescado, son solubles en un amplio rango de pH y fuerza iónica; además, suelen soportar altas temperaturas sin precipitar y poseer buenas propiedades emulsificantes, espumantes, así como también podrían presentar propiedades bioactivas. El grado de hidrólisis, y por ende el tamaño de los péptidos formados, es muy importante para definir las propiedades funcionales y bioactivas de los

hidrolizados proteicos (Gbogouri *et al.*, 2004; Klompong *et al.*, 2007; Arason *et al.*, 2009; Kelfala *et al.*, 2010).

Los péptidos bioactivos, para poder ejercer actividad *in vivo*, deben de ser resistentes a las condiciones de digestión gastrointestinal, para que puedan ser absorbidos y llegar al torrente sanguíneo en su forma activa. Su aplicación industrial y su incorporación en alimentos es otra característica que también debe considerarse ya que las características organolépticas y su estabilidad dependen de condiciones de procesamiento y almacenamiento (Hwang, 2010; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Por ejemplo, la encapsulación de péptidos ha surgido como una estrategia para evitar el sabor amargo, reducir la actividad de enzimas gastrointestinales y de bacterias, así como para mejorar su estabilidad en los alimentos funcionales (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

### **Producción de Péptidos Bioactivos**

Diversos estudios han mostrado que los péptidos bioactivos pueden ser producidos mediante la hidrólisis de fuentes proteicas por la acción de enzimas proteasas (Abubaker *et al.*, 1998; Pihlanto- Leppälä *et al.*, 2001; Kitts y Weiler, 2003), de procesos fermentativos (Yamamoto *et al.*, 1999; Gobbetti *et al.*, 2002) o por la combinación de ambas técnicas (Pihlanto- Leppälä *et al.*, 1998).

Fermentación microbiana. Durante procesos de fermentación de la leche, las bacterias ácido lácticas hidrolizan las proteínas a péptidos y aminoácidos, los cuales son usados como fuentes de nitrógeno necesarias para su crecimiento (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Por lo que, los péptidos bioactivos pueden ser generados por bacterias iniciadoras y no iniciadoras usadas en la fabricación de productos lácteos fermentados. El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas, por ejemplo, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbreuckii ssp. bulgaricus*, se encuentra bien caracterizado. Este sistema consiste de una proteasa de la pared celular y una serie de distintas peptidasas intracelulares, incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas,

tripeptidasas y dipeptidasas. La actividad de estas peptidasas se ve afectada por la condiciones de crecimiento, lo que hace posible la manipulación de la formación de los péptidos hasta cierto punto (Korhonen y Pihlanto, 2006). Sin embargo, la producción de péptidos no es tan eficiente, en cuanto al tiempo que se requiere para su generación, en comparación a la hidrólisis mediante el uso de enzimas comerciales.

Hidrólisis enzimática y métodos para su evaluación. La hidrólisis enzimática se ha empleado como un método principal para la producción de péptidos con actividad biológica a partir de subproductos del procesamiento de organismos marinos (Gbogouri *et al.*, 2004; Korhonen y Pihlanto, 2006; Arason *et al.*, 2009; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). La producción o “liberación” de los péptidos depende del sustrato con el que se esté trabajando, tipo de enzima, y condiciones del proceso de hidrólisis, tales como temperatura, pH, tiempo de reacción, etc. (Korhonen y Pihlanto, 2006). La especificidad de la enzima afecta el tamaño y cantidad de los péptidos generados, así como la composición y secuencia de aminoácidos contenidos en estos y por ende en su funcionalidad y bioactividad (Sarmadi e Ismail, 2010; Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

El uso de enzimas para hidrolizar proteínas es un proceso que puede mejorar las propiedades fisicoquímicas, funcionales, sensoriales y nutricionales de proteínas nativas, bajo condiciones controladas (Klompong *et al.*, 2007; Muzaifa *et al.*, 2012). Los hidrolizados aumentan en solubilidad conforme aumenta el grado de hidrólisis de la proteína. La alta solubilidad del hidrolizado proteico de pescado, en un amplio intervalo de pH, es una característica deseable para diversas aplicaciones alimenticias. Sin embargo, un alto grado de hidrólisis influye negativamente en otras propiedades como la espumante y emulsificante. Es por ello que dependiendo de su característica de funcionalidad será su aplicación como ingrediente funcional en alimentos (Klompong *et al.*, 2007; Muzaifa *et al.*, 2012).

Las proteasas de origen vegetal como la papaína o las de origen animal, como la pepsina, tripsina y quimotripsina (enzimas gastrointestinales) son las enzimas comerciales más utilizadas para la hidrólisis de proteínas de productos y subproductos pesqueros (Gómez-Guillén *et al.*, 2010). Tripsina se ha caracterizado por generar péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Korhonen y

Pihlanto, 2006) debido posiblemente a que esta enzima escinde enlaces péptidicos en lugares donde se encuentran lisina o arginina, liberándose péptidos que poseen aminoácidos de este tipo en el extremo del C-terminal, y para los cuales la ECA presenta una alta especificidad (Lopez-Fandiño *et al.*, 2006).

Las enzimas de origen microbiano (provenientes de hongos y bacterias, grado alimentario) como Alcalasa<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Properase<sup>®</sup> y Termolisina también han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos a partir de las proteínas de pescado (Gómez-Guillén *et al.*, 2010). Estas enzimas, en comparación con las enzimas derivadas de plantas o animales, ofrecen muchas ventajas, incluyendo una amplia variedad de actividades catalíticas, actividad a un amplio intervalo de pH, estabilidad a diferentes temperaturas, son de bajo costo, seguras y generan altos rendimientos en poco tiempo (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Así, la Alcalasa<sup>®</sup>, siendo una alcalino proteasa comercial de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*), ha sido utilizada en varios estudios para hidrolizar colágeno o gelatina debido a su amplia especificidad, así como el alto grado de hidrólisis que se puede obtener en un tiempo relativamente corto en condiciones de hidrólisis moderadas (Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Sarmadi e Ismail, 2010; Muzaifa *et al.*, 2012). Esta enzima ha manifestado una extensa actividad proteolítica durante la hidrólisis de varias tipos de muestras como: carne molida de jurel franja amarilla (Klompong *et al.*, 2007), subproductos (cabezas) de salmón del Atlántico (Gbogouri *et al.*, 2004), músculo de pez aguja *Syngnathus schlegeli* (Wijesekara *et al.*, 2011), gelatina de piel del abadejo de Alaska (Byun y Kim, 2001; Kim *et al.*, 2001), gelatina de tilapia del Nilo (Ngo *et al.*, 2010), proteína de la carpa herbívora (Chen *et al.*, 2012), merluza del Pacífico (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008) y gelatina de calamar gigante (Mendis *et al.*, 2005; Alemán *et al.*, 2011). Algunos hidrolizados producidos con alcalasa<sup>®</sup>, poseen pesos moleculares bajos y exhiben alta actividad antioxidante y antihipertensiva (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

Por otro lado, la enzima Flavourzyme<sup>®</sup> es un complejo proteasa/peptidasa de origen fúngico, producida por la fermentación sumergida de una cepa nativa seleccionada de *Aspergillus oryzae*, y se utiliza en la hidrólisis de proteínas a condiciones neutras o ligeramente ácidas (Muzaifa *et al.*, 2012). Las enzimas Alcalasa<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> son clasificadas como serin proteasas (Hsu, 2010).

A su vez, otras proteasas comerciales han sido utilizadas para la producción de hidrolizados o péptidos biológicamente activos, incluyendo la colagenasa, bromelaína, elastasa y pancreatina; así como extractos enzimáticos de vísceras de pescado (Korhonen y Pihlanto, 2006; Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

Además de la producción convencional de péptidos a partir de fuentes proteicas naturales, también se han empleado técnicas de ADN recombinante para la producción de péptidos específicos o sus precursores en microorganismos (Jeong *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009). Sin embargo, su aplicación para la obtención de péptidos bioactivos no es tan común como las técnicas convencionales (hidrólisis enzimática y fermentación microbiana), ya que son técnicas de alto costo al ser necesario un aislamiento y manipulación de fragmentos de ADN de microorganismos (Korhonen y Pihlanto, 2006; Hernández-Ledesma *et al.* 2011).

Para la producción de péptidos bioactivos con ciertas características, es necesario monitorear la actividad proteolítica de las enzimas o el grado de hidrólisis, ya que dependiendo de qué tan hidrolizada se encuentre la o las proteínas, los péptidos generados van a poseer ciertas propiedades funcionales y bioactivas.

Diferentes métodos han sido descritos en la literatura para determinar el grado de hidrólisis de proteínas llevada a cabo por la acción de enzimas proteolíticas. Dichos métodos se basan en la cuantificación de enlaces peptídicos rotos ya sea mediante la medición directa del número de grupos amino libres utilizando el reactivo OPA (orto-ftalaldehído) o TNBS (ácido trinitrobenzeno-sulfónico) o mediante técnicas de valoración estequiométricas como el pH-stat o cambios en propiedades físicas como el punto de congelación, solubilización de nitrógeno, etc.

La técnica del pH-stat (Jacobsen *et al.*, 1957) involucra la hidrólisis enzimática de una proteína y la ruptura de los enlaces peptídicos es directamente medida. Cuando los enlaces de las proteínas son hidrolizados, los residuos carboxilo (-COOH) son liberados, los cuales permiten el intercambio de iones hidronio ( $H^+$ ). Esta liberación de iones hidrógeno cargados positivamente, ocasionan que la mezcla de reacción se vuelva más ácida. Para controlar este decremento en el pH, el sistema de titulación pH-stat adiciona exactamente un titulante (base o ácido, dependiendo del pH de hidrólisis) para mantener el pH constante durante la hidrólisis. Con la cantidad de titulante utilizado,

combinado con otros datos como pK promedio, masa de proteína, enlaces peptídicos totales, y pH de reacción, etc., se calcula el grado de hidrólisis de una proteína, la cual es una medición directa de la cantidad de enlaces peptídicos que han sido hidrolizados durante el proceso hidrolítico (Nielsen *et al.*, 2001).

La osmometría es un método rápido que puede ser utilizado para muchas reacciones. Mediante el uso de un osmómetro (crioscopio) se puede medir la alteración de la depresión del punto de congelación que ocurre durante una reacción de hidrólisis. Sus limitaciones son que no se puede utilizar en soluciones muy viscosas o en soluciones con alta concentración de solutos, como la sal (Nielsen *et al.*, 2001).

El método del TNBS (ácido trinitrobenzeno-sulfónico) se basa en la reacción de los grupos amino primarios con el reactivo TNBS (Adler-Nissen, 1979). Sin embargo el método tiene sus inconvenientes, ya que es laborioso, además de no ser posible obtener resultados lo suficientemente rápido durante la hidrólisis. Además, el reactivo TNBS es inestable, tóxico, y tiene que ser manejado cuidadosamente debido al riesgo de explosión (Nielsen *et al.*, 2001).

El método del OPA (orto-ftaldialdehído) es rápido, sensible y sencillo, además de ser directamente aplicable a todas las proteínas. Este ensayo, se lleva a cabo por una reacción entre grupos amino libre y el OPA en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, formándose un compuesto colorido, el cual es detectado a 340 nm en un espectrofotómetro. El método fue descrito en detalle por Church *et al.* (1983).

El monitoreo de la hidrólisis por análisis de la cantidad de nitrógeno soluble en TCA fue propuesto por Margot *et al.* (1994). Los autores demostraron que existe una buena correlación entre el nitrógeno soluble en TCA y el consumo de base del método pH stat, donde la proteína del suero de leche se hidrolizó con tripsina.

El requisito previo para un buen rendimiento del método de nitrógeno soluble en TCA parece ser el uso de la actividad endo-peptidasa. Si el sistema enzimático incluye una mayor actividad exo-peptidasa, el resultado más probable es que exista una menor correlación entre el nitrógeno soluble en TCA y el grado de hidrólisis evaluado por el consumo de base.

## **Fraccionación y Purificación de Péptidos**

En la actualidad existen diversas técnicas para fraccionar y purificar a los péptidos potencialmente bioactivos, las cuales pueden ser utilizadas en secuencia combinada para obtener mejores resultados. Entre éstas tenemos:

Ultrafiltración. La ultrafiltración es una técnica utilizada comúnmente tanto en laboratorios como a escala comercial para fraccionar y/o purificar concentrados proteicos de diferentes fuentes alimenticias (Ghosh, 2003; Kim *et al.*, 2011).

La ultrafiltración es un método útil y ventajoso para la obtención de fracciones peptídicas con un tamaño molecular deseado. Las fracciones obtenidas pueden presentar una bioactividad superior a la del hidrolizado sin fraccionar (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Otras de las ventajas de la fraccionación a través de membranas de ultrafiltración es la producción en masa y la mejora de algunas propiedades funcionales en comparación con el hidrolizado original (Kim *et al.*, 2011). Este sistema ha sido aplicado como un primer paso para el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos a partir de diferentes materias primas de origen pesquero (Gómez-Guillén *et al.*, 2010).

Cromatografía de filtración en gel. Esta técnica, también conocida como cromatografía de exclusión molecular, separa moléculas por su tamaño; dentro de la columna cromatográfica, las moléculas grandes pasan más rápidamente que las pequeñas, ya que estas últimas son retenidas por la matriz porosa utilizada. Estos poros son bastante pequeños para excluir a los solutos grandes, reteniendo a los pequeños por lo que los primeros pasan de largo sin entrar en los poros. Las moléculas pequeñas, retenidas por la matriz, tardan más tiempo en pasar a través de la columna y por consiguiente deben requerir más volumen de elución (fase móvil) antes de abandonar la columna (Whitaker, 1994; Scopes, 1994). A diferencia de otras formas de cromatografía, las interacciones entre la “fase estacionaria” y el soluto son nulas o mínimas (Janson y Ryden, 1998).

HPLC-fase reversa. La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-fase reversa) ha sido ampliamente utilizada como una herramienta para el análisis y

purificación de biomoléculas. Este tipo de cromatografía no sólo es capaz de separar péptidos de bajo peso molecular provenientes de hidrólisis enzimáticas o purificar péptidos sintéticos, sino también, polipéptidos y proteínas de alto peso molecular. Además, se pueden separar péptidos con secuencias de aminoácidos casi idénticas, los cuales difieren de un solo residuo de aminoácido (Aguilar, 2004).

La columna (fase estacionaria sólida) contiene una matriz de naturaleza no polar sobre la cual los péptidos y polipéptidos se retienen. La columna está empacada de microesferas de sílica porosa acoplada con un derivado alquilsilano. Los alquilsilanos de entre 4 y 18 átomos de carbono (conocidos como columnas C-4 y C-18) son utilizados para modificar la superficie de la fase estacionaria. La retención del soluto se produce a través de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con la fase estacionaria de la columna, y la elución se lleva a cabo por la disminución de la naturaleza iónica, o el aumento de la hidrofobicidad del eluyente. En la separación de péptidos, estos son eluidos con gradientes en los cuales se va incrementando la concentración del solvente orgánico (fase móvil), como el acetonitrilo, conteniendo un modificador iónico, como el ácido trifluoroacético (TFA) (Sewald y Jakubke, 2002; Aguilar, 2004).

### **Biodisponibilidad de los Péptidos Bioactivos**

*In vivo*, los péptidos están sujetos a una degradación y modificación en los sistemas gastrointestinal y vascular, así como en el hígado. Por lo tanto, los péptidos deben ser capaces de superar todas estas barreras y alcanzar su objetivo (órganos blanco) en forma activa (Sarmadi e Ismail, 2010; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Se ha reconocido que las proteínas, o sus péptidos, provenientes de los alimentos son susceptibles a la hidrólisis durante las diferentes etapas de la digestión: la ingestión, digestión y absorción. Una vez ingeridos, estas proteínas y péptidos son sometidos a una hidrólisis por diferentes enzimas gastrointestinales, como la pepsina, tripsina, quimotripsina y peptidasas que se encuentran en la superficie de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, liberando péptidos de diferentes tamaños y secuencias peptídicas (Hwang, 2010). A pesar de esto, se ha reportado que péptidos de tamaño corto

pueden escapar de su digestión y ser absorbidos en forma intacta a través del espacio intersticial en el sistema linfático intestinal, pudiendo así ejercer efectos biológicos en los tejidos. La absorción intacta de estos péptidos se considera un proceso fisiológico normal, el cual es diferente de las rutas transportadoras de péptidos. Existen una serie de mecanismos para la absorción intacta de péptidos, como la ruta paracelular, la difusión pasiva, el transporte vía un acarreador, endocitosis y sistema linfático (Sarmadi e Ismail, 2010; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Sin embargo, la capacidad de los compuestos para entrar al sistema linfático intestinal se puede ver afectado por su permeabilidad a través de los capilares así como por la solubilidad lipídica. Se ha propuesto que los fármacos transportados a través del sistema linfático gastrointestinal, pueden escapar del metabolismo hepático (Sarmadi e Ismail, 2010). Una vez dentro del sistema vascular, las peptidasas plasmáticas son las que determinan la estabilidad de los péptidos en la sangre (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

El tamaño molecular y las propiedades estructurales, como la hidrofobicidad, afectan la ruta más importante de transporte para péptidos. Recientes descubrimientos indican que péptidos de 2 a 6 residuos de aminoácidos, son absorbidos más fácilmente en comparación con las proteínas y los aminoácidos libres. Además, se ha observado que los péptidos que contienen prolina y/o hidroxiprolina en su estructura, son más resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas (Sarmadi e Ismail, 2010).

Para evaluar la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos, se han realizado estudios *in vitro* en los cuales se ha evaluado la resistencia de estos péptidos a los procesos gastrointestinales mediante una hidrólisis secuencial con pepsina y extractos pancreáticos, imitando las condiciones gastrointestinales, y con células del epitelio intestinal (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

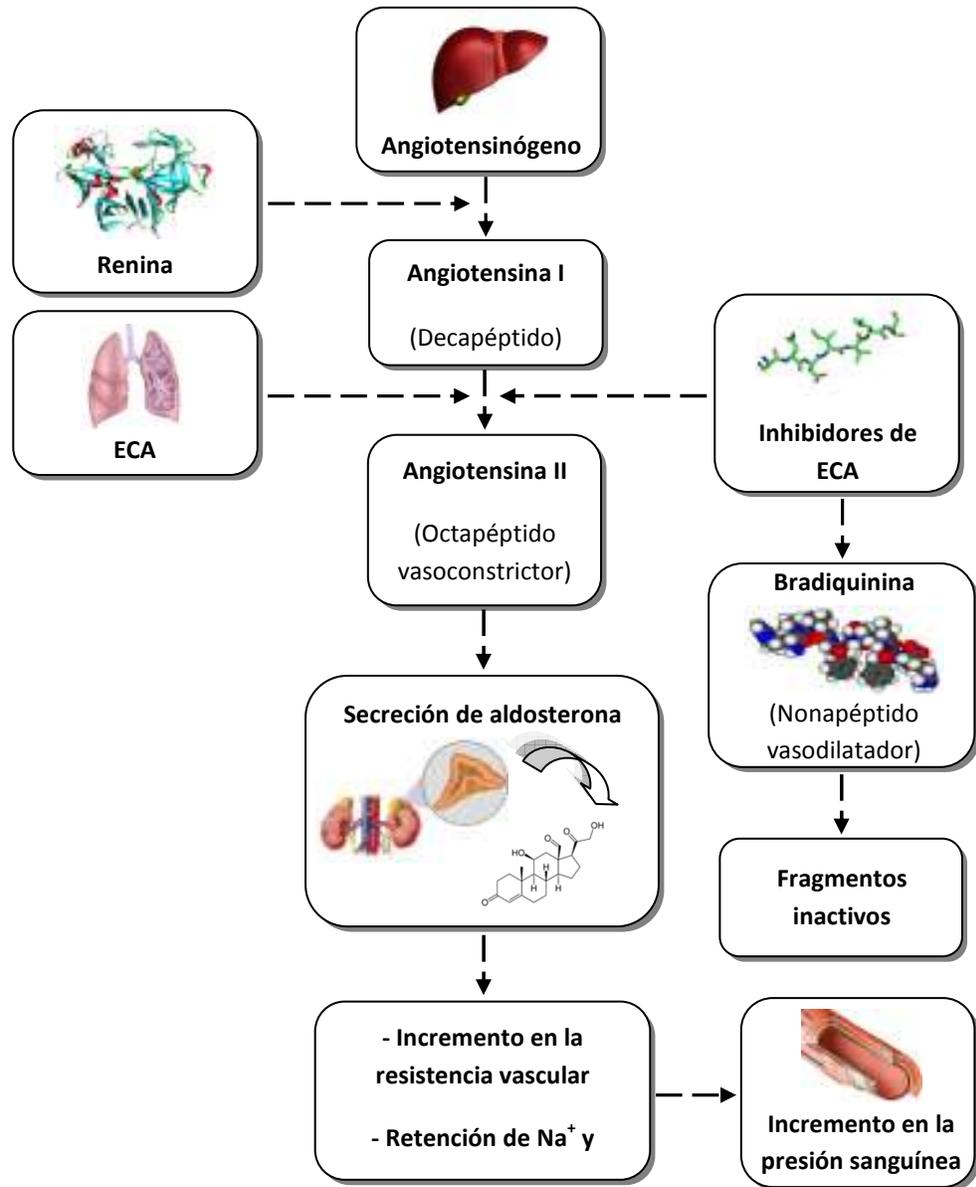
## **Propiedades Biológicas de Péptidos**

Actividad antihipertensiva. La hipertensión es un problema de salud pública, cuya prevalencia está en aumento en proporciones epidémicas, tanto en países desarrollados

como en países en vías de desarrollo (Jimsheena y Gowda, 2010). Esta enfermedad afecta a un 15-20% de todos los adultos a nivel mundial. Es considerada una enfermedad crónica y uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, y la etapa final de la enfermedad renal (Lee *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011). La hipertensión, se define como una presión arterial sistólica por encima de 140 milímetros de mercurio (mm\_Hg) y/o una presión arterial diastólica por encima de 90 mm\_Hg (Balti *et al.*, 2010). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) juega un papel fisiológico importante en la regulación de la presión sanguínea, al estar asociada al sistema renina-angiotensina (Nii, *et al.*, 2008; Raghavan y Kristinsson, 2009; Lee *et al.*, 2010). El sistema renina-angiotensina, además de participar en el mantenimiento de la homeostasis de la presión sanguínea, también influye en el balance de líquidos y sal en mamíferos (Lee *et al.*, 2010).

La enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4.15.1) (peptidildipéptido hidrolasa o peptidil carboxipeptidasa), es una metalopeptidasa dependiente de  $Zn^{+2}$  y  $Cl^-$  para su activación (Lee *et al.*, 2011). Se encuentra distribuida en el endotelio vascular, epitelio absorptivo, neuroepitelio y en células germinales de mamíferos machos, con alto contenido en el tejido pulmonar, (Hwang y Ko, 2004; Pan *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2012). La enzima cataliza la hidrólisis del decapeptido angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), una sustancia fisiológicamente inactiva, para la conversión al potente vasoconstrictor octapéptido angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) y la liberación del dipéptido His-Leu. En seres humanos y animales, a medida que la angiotensina II causa la constricción de los vasos sanguíneos se da la liberación de aldosterona por la corteza suprarrenal, lo que a su vez conduce a una acumulación de iones sodio en el cuerpo humano y a un incremento en la presión sistólica (Figura 1). Además, la ECA influye de manera indirecta en el sistema calicreína-quinina suprimiendo los efectos vasodilatadores del nonapéptido bradiquinina, el cual exhibe actividad hipotensiva (Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

## SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA



**Figura 1.** Sistema regulador de la presión arterial (renina – angiotensina).

**Compuestos inhibidores de ECA.** Los inhibidores de ECA reducen la formación de la angiotensina II y la degradación de la bradiquinina, disminuyendo así la vasoconstricción de las arterias, produciendo un efecto hipotensor. Por lo anterior, los péptidos inhibidores de ECA son considerados agentes potenciales para el tratamiento de la hipertensión arterial, empleándose como ingredientes funcionales en suplementos dietéticos o para el desarrollo de nuevos fármacos (Iwaniak y Minkiewicz, 2007; Gu *et al.*, 2011).

Uno de los primeros péptidos exógenos inhibidores de ECA fue descubierto del veneno de serpiente *Bothrops jararaca* (Ondetti *et al.*, 1971). Aunque es un potente péptido presenta limitaciones farmacológicas debido a que aumenta la actividad de la bradiquinina (potente vasodilatador). Hoy en día, derivados sintéticos como el captopril, lisinopril, enalapril, alacepril y fosinopril, han sido empleados como medicamentos antihipertensivos comerciales para el control de la hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca y neuropatía diabética (Hsu *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, se sabe que estos inhibidores sintéticos presentan varios efectos secundarios, tales como tos seca, reducción de la función renal, angioedema, incremento de los niveles de potasio, hipotensión, erupciones en la piel y anomalías fetales (Lee *et al.*, 2010; Wijesekara y Kim, 2010). Debido a esto, en los últimos 10 años se han estudiado extensivamente e identificado péptidos naturales con actividad inhibitoria de ECA provenientes de varias fuentes proteicas, como la leche (López-Fandiño, *et al.*, 2006), caseína (Silva y Malcata, 2005), músculo esquelético de cerdo (Arihara *et al.*, 2001), soya (Kuba *et al.*, 2005), músculo de sardina (Matsufuji *et al.*, 1994), músculo de salmón (Ono *et al.*, 2006), piel de tiburón (Lee *et al.*, 2011), proteína de ostión (Wang *et al.*, 2008), alga wakame (Sato *et al.*, 2002), gelatina de piel de Alaska pollack (Byun y Kim, 2001), colágeno extraído de piel de salmón del Atlántico (Gu *et al.*, 2011), cabezas y vísceras de sardina (*Sardinella aurita*) (Bougatef *et al.*, 2008), proteínas miofibrilares de Haruan (*Channa striatus*) (Ghassem *et al.*, 2011), subproducto de camarón boreal o nórdico (*Pandalus borealis*) (Gildberg *et al.*, 2011), entre otras.

En el mercado de suplementos alimenticios existen productos que contienen hidrolizados de proteínas de pescado, los cuales pueden reducir la presión arterial. Tal es el caso del oligopéptido Katsuobushi<sup>®</sup> que ha sido aprobado por las autoridades

japonesas. Este oligopéptido (Leu-Lys-Pro-Asn-Met) se obtuvo mediante la hidrólisis enzimática del músculo de bonito con la proteasa termolisina<sup>®</sup> (secretada por *Bacillus thermoproteolyticus*). Este oligopéptido es hidrolizado en el sistema gastrointestinal por las enzimas digestivas (pepsina, tripsina y quimotripsina) a los péptidos Leu-Lys-Pro (LKP) y Asn-Met y en la sangre por proteasas plasmáticas. El péptido LKP es la forma activa del oligopéptido y es la que exhibe actividad antihipertensiva. Diversos estudios clínicos en humanos han confirmado su eficacia sin ningún efecto secundario. Este producto se puede usar solo o con otros suplementos y medicamentos recetados. Se comercializa con el nombre de Peptide ACE 3000<sup>®</sup> en Japón, en los Estados Unidos como Vasotensin<sup>®</sup>, y en Canadá con los nombres de PeptACE<sup>™</sup> y Levernorn<sup>™</sup> (Thorkelsson y Kristinsson, 2009, Guérard *et al.*, 2010).

Otro de los productos comerciales con propiedades antihipertensivas es el Sardine peptide SP100N, el cual es un hidrolizado de músculo de sardina. Este hidrolizado contiene altas concentraciones del péptido Val-Tyr, el cual mantiene los vasos sanguíneos en estado normal (saludable), ya que suprime la creación de la angiotensina II, mediante la inhibición de la ECA. La eficacia de SP100N ha sido probada clínicamente en Corea y Japón, y se vende como un alimento funcional el cual funciona de manera efectiva reduciendo la presión arterial alta. Este producto fue aprobado por la FDA en Corea y por el Ministerio de Salud en Japón (Thorkelsson y Kristinsson, 2009).

Los péptidos antihipertensivos de origen marino han demostrado poseer una potente actividad inhibitoria de la ECA. La actividad de inhibición de estos péptidos se expresa con el parámetro IC<sub>50</sub>, el cual se define como la concentración de inhibidor necesaria para inhibir la actividad de la ECA en un 50% (Wijesekara y Kim, 2010).

Diferentes estudios concuerdan que varios péptidos inhibidores de la ECA poseen de 2 a 12 residuos de aminoácidos (específicos) en su estructura, ya que el sitio activo de la ECA no puede acomodar grandes moléculas peptídicas. (Byun y Kim, 2002).

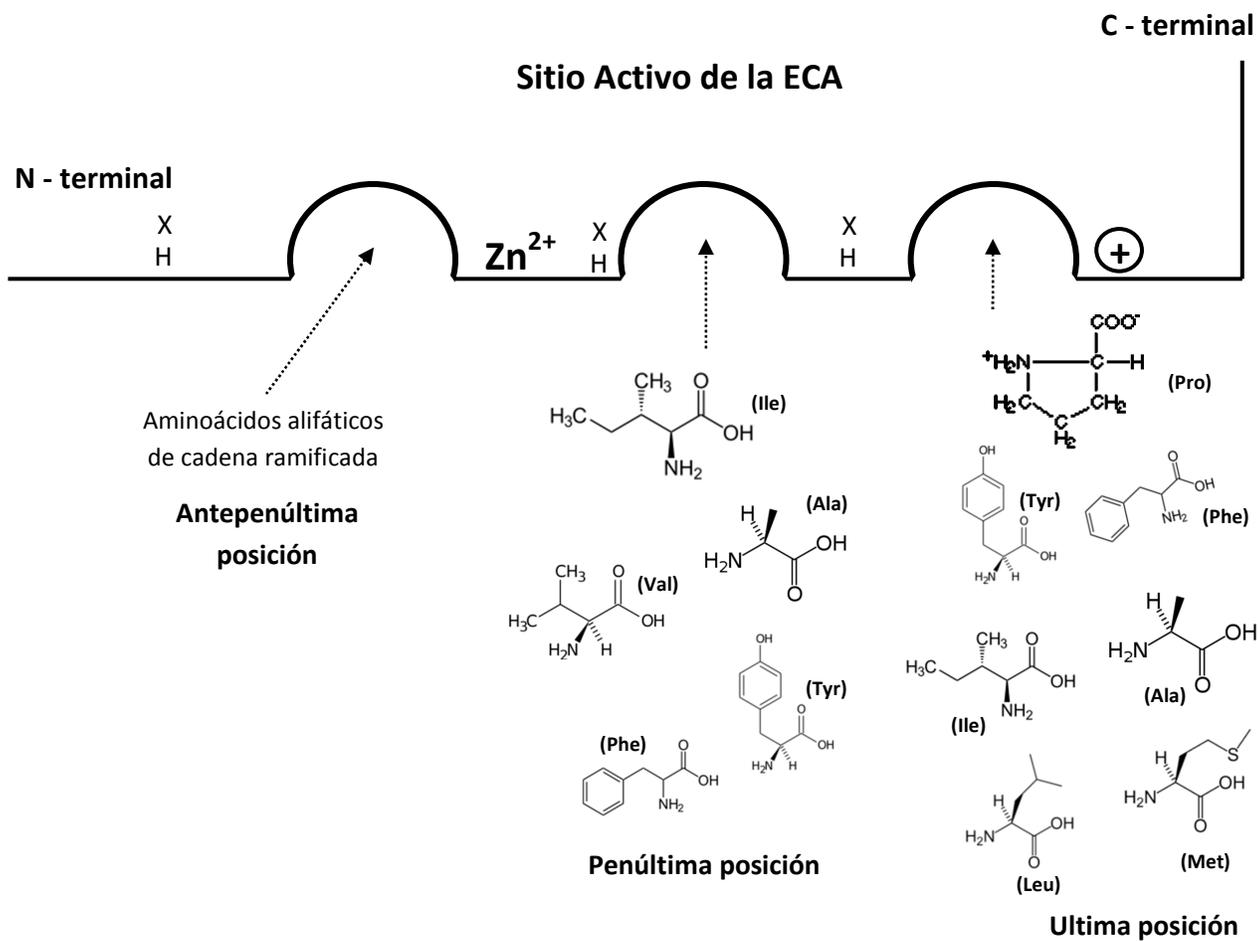
Ondetti *et al.* (1971) propusieron un modelo para establecer la interacción de los sustratos o inhibidores competitivos con el centro activo de la ECA. En este modelo se propone que el centro activo de la ECA está constituido por 3 subunidades que pueden

interactuar potencialmente con los aminoácidos de los sustratos o inhibidores de la enzima (Figura 2). Una de las subunidades de la ECA presenta un grupo con carga positiva que forma un enlace iónico con el grupo carboxilo terminal del péptido. La siguiente subunidad posee un grupo capaz de interactuar con el enlace peptídico del aminoácido carboxilo terminal, probablemente mediante un puente de hidrógeno. La tercera subunidad presenta un átomo de  $Zn^{2+}$  que es capaz de polarizar el grupo carbonilo del enlace peptídico entre el antepenúltimo y penúltimo aminoácido del sustrato haciéndole más susceptible a la hidrólisis (Ondetti y Cushman, 1982).

Los inhibidores de ECA se pueden unir al sitio activo de esta enzima o en otro lugar lejos del sitio activo, alterando su conformación e impidiendo que el sustrato se una al sitio activo (Wijesekara y Kim, 2010).

Los péptidos inhibidores de ECA aislados y caracterizados hasta el momento, muestran algunas características comunes. Por ejemplo, la ECA parece tener preferencia por sustratos o inhibidores competitivos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadenas laterales ramificadas) en una de las tres posiciones del extremo C-terminal (carboxilo terminal), presentando poca afinidad por péptidos con aminoácidos dicarboxílicos en el extremo C-terminal o con aquellos péptidos que poseen el aminoácido prolina en la penúltima posición. Sin embargo, la presencia de este aminoácido en la última o antepenúltima posición favorece la unión del péptido con la enzima (Kitts y Weiler, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006).

En una revisión efectuada por Kitts y Weiler (2003), además de los resultados obtenidos por Byun y Kim (2002), señalan que péptidos con actividad antihipertensiva constan de residuos de aminoácidos como lisina, arginina, prolina, fenilalanina, triptofano y tirosina en las últimas 3 posiciones del extremo C-terminal. Siendo los péptidos más bioactivos aquellos que poseen prolina en su extremo C-terminal. Además, se ha demostrado que péptidos que contienen prolina en su estructura, son por lo general más resistentes a la degradación por enzimas digestivas. Asimismo, se ha reportado que los tripéptidos que poseen prolina en el extremo C-terminal y la presencia de un residuo de aminoácido de cadena ramificada alifático (valina, leucina o isoleucina) en el extremo N-terminal, exhiben alta actividad inhibitoria de ECA. Basado en lo anterior, los



**Figura 2.** Correlación de las 3 últimas posiciones del extremo C-terminal en péptidos inhibidores de ECA y las subunidades del sitio activo de la ECA.

tripéptidos más estudiados han sido aquellos de secuencia Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro (Rao *et al.*, 2012).

**Evaluación de la actividad inhibitoria de ECA.** La evaluación de la actividad inhibitoria de la ECA por péptidos bioactivos se basan en métodos colorimétricos o espectrofotométricos, fluorométricos y principios de HPLC y electroforesis capilar. Estas técnicas emplean diferentes sustratos para evaluar la actividad de la Enzima en presencia y ausencia de inhibidores, siendo los péptidos sintéticos hipuril-histidil-leucina (HHL) y el FAPGG (Furanacryloyl-Phe-Gly-Gly), los sustratos más utilizados (Lahogue *et al.*, 2010).

Uno de los métodos más empleados para medir la actividad inhibitoria de péptidos sobre la ECA es el desarrollado por Cushman y Cheung (1971), y se basa en la medición espectrofotométrica (a 228 nm) del ácido hipúrico que se forma al después de incubar el sustrato sintético HHL con la ECA en presencia de sustancias inhibitorias. Este método consta de varias etapas que incluyen la extracción del ácido hipúrico con acetato de etilo, evaporación, disolución en agua y medición de la absorbancia del ácido hipúrico extraído. Algunas modificaciones incluyen la sustitución del proceso de extracción del ácido hipúrico con acetato de etilo, por una reacción específica del dipéptido His-Leu con el compuesto TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico) (Matsui *et al.*, 1992) o haciendo reaccionar ácido hipúrico con cloruro de sulfonil benzeno (Li *et al.*, 2005).

El método espectrofotométrico desarrollado por Vermeirssen *et al.* (2002), utiliza como sustrato el tripéptido modificado Furanacryloyl-Phe-Gly-Gly (FAPGG) y como enzima un extracto acetónico obtenido a partir del pulmón de conejo. Mientras que el método HPLC acoplado a espectrometría de masas permite la determinación e identificación de los péptidos inhibitorios de la enzima simultáneamente (Van Elswijk *et al.*, 2003).

Para determinar el efecto antihipertensivo *in vivo* de compuestos inhibitorios de la ECA se utilizan normalmente ratas espontáneamente hipertensas (SHR por sus siglas en inglés) como un modelo de hipertensión humana esencial. Además, con el objeto de comprobar que los inhibitorios de la ECA no modifican la presión arterial de sujetos no

hipertensos, muchos estudios emplean ratas Wistar-Kyoto como control normotenso de las SHR (López-Fandiño *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010). Estos experimentos constituyen una etapa previa a la realización de ensayos clínicos en humanos.

Actividad antioxidante. La oxidación lipídica es uno de los problemas de gran preocupación para la industria alimentaria y consumidores, debido a que conduce a la pérdida de calidad de los alimentos. El desarrollo de sabores y olores desagradables, con la consecuente generación de productos potencialmente tóxicos conlleva al detrimento de la vida útil del alimento (Lin y Liang, 2002; Je *et al.*, 2005; Bougatef *et al.*, 2010). La oxidación de lípidos, con la consecuente generación de radicales libres, es causante parcial de numerosos trastornos de la salud, como cáncer, diabetes y enfermedad de Alzheimer (Díaz *et al.*, 1997; Bougatef *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011).

Para ayudar a prevenir estos problemas, es muy importante evitar al máximo de lo posible la peroxidación de lípidos en alimentos y en el organismo. Con el fin de retrasar cambios oxidativos indeseables (decoloración, deterioro y formación de compuestos potencialmente tóxicos en el alimento), la utilización de antioxidantes en el procesamiento de los alimentos es recomendable (Decker *et al.*, 2005; Bougatef *et al.*, 2010). Un antioxidante se define como cualquier sustancia que retrasa significativamente o inhibe la oxidación de una sustancia cuando está presente en concentraciones bajas, en comparación con la del sustrato oxidable (Jun *et al.*, 2004; Bougatef *et al.*, 2009). Los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles en una secuencia oxidativa, siendo más importante, su capacidad para parar la reacción en cadena para evitar la formación de radicales libres. La reacción en cadena puede ser inhibida mediante la adición de compuestos que retarden la formación de radicales libres o por la introducción de sustancias que compitan con los radicales existentes y los neutralice del medio de reacción (Jun *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2010).

La formación de radicales libres, como el anión radical superóxido y el radical hidroxilo, es una consecuencia inevitable en organismos aerobios, como lo son los seres humanos. Los radicales libres se producen fisiológicamente de forma natural, ya que ejercen diversas funciones como son los procesos de señalización celular relacionados con la transducción de receptores de membrana, además de proporcionar protección

contra diversas infecciones. Sin embargo, estos radicales son muy inestables y reaccionan rápidamente con otros grupos o sustancias del organismo (Je *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Sarmadi e Ismail, 2010). En condiciones normales, los radicales libres son eliminados de forma efectiva por los sistemas de defensa antioxidante de los organismos, como son las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa), así como factores no enzimáticos (vitaminas, coenzimas, cofactores y elementos traza). Sin embargo, un cambio en el balance entre la generación y eliminación de radicales libres conduce a una sobreproducción de éstos o a una disminución de la desintoxicación, dando como resultado de estos eventos, un daño en diversas biomacromoléculas, como son proteínas, mutaciones en el ADN, oxidación de fosfolípidos de membrana y modificación de lipoproteínas de baja densidad. Por lo tanto, los antioxidantes pueden prevenir la formación o desintoxicación de radicales libres dentro de un sistema (Shei *et al.*, 2009; Phanturat *et al.*, 2010; Sarmadi e Ismail, 2010).

**Compuestos con propiedades antioxidantes.** Muchos de los antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el galato de propilo son utilizados como aditivos alimentarios para evitar el deterioro en alimentos (Kulisic *et al.*, 2004; Bougatef *et al.*, 2010). Estos no detienen la formación de radicales que se generan durante la oxidación, sino que reaccionan con los radicales libres formados, neutralizándolos; a pesar de que durante este proceso, el antioxidante mismo se transforma en un radical libre, éste es estabilizado por resonancia de su estructura, siendo menos activos. A pesar de que estos antioxidantes sintéticos pueden mostrar mayor actividad antioxidante que los naturales, tales como el ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol, el uso de estos compuestos ha tenido que ser limitado y normatizado, ya que estudios han indicado que pueden inducir daño al DNA, proteínas, lípidos de membrana y a pequeñas moléculas celulares (Bougatef *et al.*, 2010). Estos daños han sido asociados a diversos procesos patológicos, incluyendo la osteoartritis, artritis, diabetes, cataratas, distrofia muscular, disfunción pulmonar, trastornos inflamatorios y neurológicos (Jun *et al.*, 2004).

En los últimos años, la tendencia por parte de los consumidores para elegir alimentos “naturales” ha incrementado. Existe un gran interés por parte de la industria e investigadores en la búsqueda de nuevos antioxidantes de origen natural para su uso en productos alimenticios y medicinales que vengan a sustituir a los antioxidantes sintéticos. A pesar de que los antioxidantes sintéticos han mostrado ser más eficientes que los antioxidantes naturales, los antioxidantes naturales, en altas dosis de aplicación pueden exhibir el mismo o mejor efecto (Sarmadi e Ismail, 2010). La vitamina C, el  $\alpha$ -tocoferol y los compuestos fenólicos, que están presentes de forma natural en verduras, frutas y semillas, poseen la capacidad de reducir el daño oxidativo asociado a enfermedades, incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, etc. (Bougatef *et al.*, 2010).

En años recientes, los hidrolizados de varias fuentes proteicas de origen natural (animales y plantas) han sido estudiados como posibles antioxidantes, entre éstos tenemos a la caseína de la leche (Blanca *et al.*, 2007), soya (Gibbs *et al.*, 2004), proteína de la semilla de quinoa (Aluko y Monu, 2003), proteína de la yema del huevo (Sakanaka *et al.*, 2004) y proteínas miofibrilares del musculo porcino (Saiga *et al.*, 2003). Además, productos y subproductos de la industria pesquera han demostrado ser buenas fuentes de péptidos, tales como la proteína de la especie *Mustelus mustelus* (Bougatef *et al.*, 2009), del capelán (*Mallotus villosus*) (Amarowicz y Shahidi, 1997), macarela (Wu *et al.*, 2003), gelatina de la piel de calamar gigante (Mendis *et al.*, 2005), gelatina de las tónicas de calamar gigante (Alemán *et al.*, 2011), hidrolizados de gelatina de la piel de Alaska pollack (Kim *et al.*, 2001), subproducto de Alaska pollack (Je *et al.*, 2005), músculo molido de jurel franja amarilla *Selaroides leptolepis* (Klompong *et al.*, 2007), subproducto de atún (Je *et al.*, 2007), entre otras especies.

En el mercado internacional existe un producto comercial que contiene un hidrolizado de pescado y su consumo está relacionado con mejoras en la salud. Tal es el caso de Fortidium LIQUAMEN<sup>®</sup>, un autolizado del pescado blanco (*Molva molva*) originario del Atlántico Norte, el cual exhibe múltiples efectos como reducción del estrés oxidativo por sus propiedades antioxidantes que protegen al cuerpo contra los radicales libres, reducción del índice glicémico y antiestrés. Este producto es comercializado como suplemento alimenticio (Guérard *et al.*, 2010).

El mecanismo exacto por el cual los péptidos actúan como antioxidantes no se ha elucidado por completo. Pero varios estudios han demostrado que son inhibidores de la peroxidación lipídica, ya que actúan como estabilizadores de radicales libres y como agentes quelantes de iones metálicos, (Sarmadi e Ismail, 2010; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). La capacidad de los péptidos para quelar metales, principales prooxidantes en alimentos, depende del pH ya que una carga aniónica neta será establecida en el péptido a un pH por encima de su pI. Esta carga, puede conducir a la atracción electrostática entre el péptido y el metal catiónico, inhibiendo con ello el inicio de la oxidación, es decir la formación del primer radical libre (Arason *et al.*, 2009). La inhibición de radicales libres por antioxidantes naturales ha sido reportada que sucede con la donación de átomos de hidrógeno hacia el radical libre. Ciertos péptidos (antioxidantes naturales) donadores de electrones pueden reaccionar con radicales libres y terminar la reacción en cadena llevada a cabo por los mismos (Gómez-Guillén *et al.*, 2010).

Los péptidos antioxidantes provenientes de los alimentos son considerados compuestos de fácil absorción, seguros, saludables, de bajo costo y efectivos. Además, poseen algunas ventajas en comparación a los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) ya que al tener una estructura simple (bajo peso molecular), exhiben mayor estabilidad en diferentes situaciones, además no ocasionan inmunorreacción en el cuerpo humano (Sarmadi e Isamil, 2010).

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición y secuencia de aminoácidos, estructura, masa molecular e hidrofobicidad (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Se ha observado que los péptidos que contienen histidina, metionina, lisina, cisteína, leucina, glicina, prolina y aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), poseen actividad antioxidante (Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Sarmadi e Ismail, 2010; Alemán *et al.*, 2011). La presencia de un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en la secuencia peptídica podría aumentar la solubilidad del péptido en los lípidos y con ello aumentar la posibilidad de actuar como antioxidante (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Los péptidos con residuos de aminoácidos aromáticos convierten los radicales libres a moléculas estables mediante la donación de electrones, manteniendo su propia estabilidad a través de su estructura de resonancia. En el caso de los péptidos que contienen histidina (His), se ha propuesto que su actividad antioxidante

está relacionada con la donación de un átomo de hidrógeno, captación del radical peroxilo del lípido y/o la capacidad del grupo imidazol para quelar iones metálicos. Por otra parte, el grupo -SH de cisteína tiene una acción antioxidante crucial, debido a su interacción directa con los radicales, ya que este grupo le da al aminoácido su capacidad electro donadora (Sarmadi e Ismail, 2010).

**Evaluación de la actividad antioxidante.** Existen diferentes métodos los cuales han sido empleados para medir la capacidad antioxidante de un compuesto. Éstos se clasifican en 2 grupos: Los métodos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno, y los métodos basados en la transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005). La mayoría de los métodos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno aplica una reacción competitiva. La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), el parámetro de captación o atrapamiento de radicales totales (TRAP) y el ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno, son ejemplos de métodos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno. Los ensayos basados en la transferencia de electrones miden la capacidad de un antioxidante para reducir a un oxidante, el cual actúa como el control para monitorear la reacción y como el indicador del final de la reacción. La capacidad antioxidante de los equivalentes de Trolox (TEAC), el poder antioxidante reductor del ión férrico (FRAP) y la capacidad de captación de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), son ejemplos de métodos basados en la transferencia de electrones, los cuales son usados frecuentemente para medir actividad antioxidante de péptidos (Zulueta *et al.*, 2009; Sarmadi e Ismail, 2010).

La prueba para evaluar la actividad de captación de radicales DPPH es una técnica colorimétrica que mide la tasa de actividad antioxidante, la cual depende de la reacción  $\text{DPPH}^* + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^*$  para un antioxidante específico (AH) produciendo un radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil estable. Básicamente se realiza una mezcla del antioxidante con la solución de DPPH disueltos en etanol. La reacción se mezcla por 60 minutos manteniendo la temperatura a 25 °C. Finalmente se mide la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS. En forma de radical, el DPPH tiene una banda de absorción a 517 nm, la cual desaparece cuando actúa un

compuesto sobre él, neutralizándolo. Así, una baja absorbancia de la mezcla de reacción indica una alta actividad de captación de radicales libres. (Bersuder *et al.*, 1998).

Existen otros métodos para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto durante el almacenamiento de un alimento. Los métodos más comunes incluyen el valor o índice de peróxido y el de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés). Ambos métodos son complementarios ya que el primero evalúa los productos primarios de la oxidación (peróxidos formados) mientras que la segunda evalúa los productos secundarios de la misma. La actividad antioxidante también puede ser estudiada por ensayos de quelación de metales, los cuales miden la protección que ofrece un compuesto contra la actividad de oxidación catalizada por metales de transición, como el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Sarmadi e Ismail, 2010).

Otras propiedades bioactivas. Algunos péptidos aislados a partir de productos y subproductos pesqueros han exhibido otras actividades biológicas adicionales a las descritas en párrafos anteriores; entre estas tenemos la antiproliferativa y la antimicrobiana.

Respecto a la actividad antiproliferativa, los péptidos ejercen su actividad mediante la supresión de la tumorigénesis o generación de células cancerígenas por diferentes mecanismos, como la inhibición de la actividad proteolítica mediada por la célula tumoral, atenuación de la angiogénesis tumoral, inducción de apoptosis e/o inmunoestimulación (Sheih *et al.*, 2010). La mayoría de los péptidos con actividad antiproliferativa han exhibido pesos moleculares <5 kDa, los cuales en su mayoría son del tipo hidrofóbico (Alemán *et al.*, 2011). Se han identificado péptidos que han expresado esta actividad en hidrolizados de gelatina de calamar (Alemán *et al.*, 2011), hidrolizado de un subproducto generado durante la producción de la esencia del alga *Chlorella vulagris* (Sheih *et al.*, 2010), hidrolizados de salsa de anchoas (producto fermentado) (Lee *et al.*, 2004), hidrolizados de tilapia (Chen *et al.*, 2009), etc.

Se ha encontrado que los péptidos que ejercen actividad antimicrobiana comúnmente tienen menos de 50 aminoácidos (de los cuales cerca del 50% son hidrofóbicos) y poseen pesos moleculares <10 kDa. Estos péptidos pueden ser generados *in vitro* mediante una hidrólisis enzimática (Najafian y Babji, 2012).

La actividad antimicrobiana de un péptido se expresa generalmente por la desintegración de la bicapa lipídica de la membrana celular (Kitts y Weiler, 2003). La mayoría de estos péptidos contienen una estructura de hélice alfa, son catiónicos y anfipáticos. El carácter hidrófobo de algunos aminoácidos contenidos en estos péptidos permite la porosidad de la membrana bacteriana, uniéndose los péptidos catiónicos a los fosfolípidos de la membrana celular, lo que provoca una lisis celular (Kitts y Weiler, 2003).

Diversos estudios han reportado que los péptidos antimicrobianos de origen marino tienen funciones antibacterianas o bacteriostáticas contra varias cepas de Gram positivas y negativas (Najafian y Babji, 2012). Además se han encontrado péptidos antimicrobianos en especies como el *Misgurnus anguillicaudatus* (anguila), *Salmo salar* (salmón), *Ictalurus punctatus* (bagre), *Parasilus asotus*, *Pardachirus marmoratus*, *Cyprinus carpio* (carpa). Su peso molecular varía desde los 2.5 kDa a los 31 kDa aproximadamente, además de poseer en su estructura los aminoácidos arginina y lisina (Kitts y Weiler, 2003).

## **HIPÓTESIS**

La hidrólisis proteica del homogenado de subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) genera péptidos de bajo peso molecular potencialmente antihipertensivos y antioxidantes.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Aislar péptidos potencialmente antihipertensivos y antioxidantes, generados a partir de la hidrólisis proteica del homogenado de subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

### Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de hidrólisis (enzima, concentración de enzima y tiempo de reacción) para la obtención de hidrolizados a partir del homogenado de los subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey.
- Separar fracciones peptídicas (<1 y 1-5 kDa) por medio de la técnica de ultrafiltración y evaluar actividad antihipertensiva (actividad inhibitoria de ECA) y antioxidante (ensayo de captación de radicales DPPH) a cada una de las fracciones obtenidas.
- Aislar los péptidos de las fracciones con mayor actividad antioxidante y antihipertensiva por HPLC y evaluar actividad inhibitoria de ECA y actividad de captación de radicales DPPH a cada fracción peptídica aislada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia Prima

Los subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey (colas y cabezas) se obtuvieron en el mismo momento de su procesamiento en la empresa enlatadora Productos Pesqueros de Guaymas (Propeguay) S.A. de C.V., localizada en el puerto de Guaymas, Sonora, México. Dichos subproductos fueron empacados en bolsas ziploc<sup>®</sup> para congelación y enhielados en capas alternas de hielo-muestra-hielo para ser transportados a la planta piloto del Laboratorio de Calidad de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se realizaron 3 muestreos (de 20 kg cada uno) en el mes de julio del año 2011. Una vez en la planta piloto se efectuó un macerado (homogenado) de las diferentes muestras como se describe en el siguiente punto. El tiempo transcurrido desde su enhielado hasta la obtención del homogenado, no excedió de 6 horas.

### Producción del Homogenado de los Subproductos de Sardina Monterey

Para la obtención del homogenado, las cabezas y las colas se colocaron en una cortadora-mezcladora industrial (Talsa C-35 STP) y fueron procesadas por 1 minuto por batch a máxima velocidad. El homogenado se colocó en bolsas de plástico ziploc<sup>®</sup> en porciones de 2.5 kg, y congeló a -20°C hasta su utilización.

## Análisis Químico

Con el fin de caracterizar la materia prima con la cual se trabajó en el presente estudio y determinar la posible variación existente, en cuanto a composición proximal entre los muestreos realizados en diferentes días de procesamiento, se evaluó la composición del homogenado. El análisis químico consistió en la determinación de humedad (método 950.46), proteína (método 981.10), lípidos (método 960.39) y cenizas (método 938.08) de acuerdo a la metodología de la AOAC (1990). Además se evaluó el contenido de nitrógeno no proteico (NNP) empleando el método de Woyewoda *et al.* (1986).

Para la determinación del contenido de nitrógeno no proteico en los ultrafiltrados liofilizados, se empleó el método 981.10 (técnica para cuantificación de proteína) propuesto en la AOAC (1990).

## Selección de Condiciones de Hidrólisis

Con la finalidad de determinar qué condiciones de hidrolisis son las más adecuadas para producir los péptidos de bajo peso molecular con posible actividad antihipertensiva y/o antioxidante, se realizó la hidrólisis enzimática del homogenado empleando varias enzimas (*Protex 6L*<sup>®</sup>, *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Flavourzyme*<sup>®</sup>) a diferentes concentraciones de enzima (0.5, 1 y 2% v/p) y tiempos de hidrólisis (0.5, 1, 2, 4 y 6 horas). Con la finalidad de estandarizar el proceso hidrolítico se procedió a inactivar las proteasas presentes en el homogenado mezclando 100 g de homogenado en 100 mL de agua destilada (previamente calentada a 95 °C), para posteriormente mantener la mezcla por 15 min a 100 °C, enfriada a temperatura ambiente y homogenizada por 2 min a <10 °C a una velocidad de 50,000 rpm, empleando un homogenizador de tejido Tizzard Tekmar Modelo SDT 1810 (Tekmar Co. W. Germany). Las condiciones de hidrolisis fueron de pH 9.5 y 60 °C para *Protex 6L*<sup>®</sup> y pH 8 y 50 °C para *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Flavourzyme*<sup>®</sup> (pH ajustado con NaOH 2N), a las concentraciones y tiempos descritos

arriba. La hidrólisis fue finalizada mediante la inactivación de la enzima por calentamiento a 85 °C por 15 min con agitación ocasional.

### Evaluación del Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó mediante la medición del contenido de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 10% siguiendo la metodología propuesta por Margot *et al.* (1994). Brevemente, una alícuota de 10 mL de hidrolizado se mezcló con 10 mL de TCA al 10% y homogenizó con homogenizador de tejido Tizzumer Tekmar Modelo SDT 1810 (Tekmar Co. W. Germany) a una velocidad de 50,000 rpm durante 1 min a <10 °C. La mezcla se centrifugó a 10,000 × g a 25 °C por 15 minutos, utilizando una centrifuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments INC. Palo Alto, CA). El sobrenadante se filtró utilizando papel Whatman No. 4. El nitrógeno soluble en el sobrenadante y el nitrógeno total fueron determinados por el método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990). El porcentaje de grado de hidrólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Grado de hidrólisis} = \frac{\text{nitrógeno soluble en TCA al 10\% (mg)} \times 100}{\text{nitrógeno total (mg)}}$$

### Análisis de Proteínas en Geles de SDS-Poliacrilamida

La hidrólisis de las proteínas por las diferentes enzimas se visualizó mediante una electroforesis de SDS-poliacrilamida en geles discontinuos, utilizando un gel de resolución (resolving gel) al 17% y un gel de concentración (stacking gel) al 4% (Laemmli, 1970). Todas las muestras (hidrolizados y homogenado) se prepararon con 1 g de cada una estas y 9 mL de una solución que contenía 5% de SDS (dodecil sulfato de sodio) y 0.1% de β-mercaptoetanol. Posteriormente, se homogenizó la mezcla en un homogenizador de tejido Tizzumer Tekmar Modelo SDT 1810 (Tekmar Co. W. Germany), durante 1 min a temperatura ambiente, a una velocidad de 50,000 rpm.

Después se calentó la mezcla por 60 min a 80 °C y fue enfriada a temperatura ambiente. Una vez finalizado el paso anterior, se llevó a cabo una centrifugación a 25 °C por 15 minutos a  $3,030 \times g$ , en una centrífuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments INC. Palo Alto, CA). El sobrenadante obtenido fue filtrado con papel Whatman No. 4 y mezclado con una solución buffer muestra (conteniendo Tris-HCl 0.125M pH 6.8, 4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) en una relación 1:1. Las muestras fueron inyectadas en los geles de electroforesis a una concentración de 20  $\mu$ g de proteína y/o peptidos/mL (por pozo), realizándose la corrida electroforética utilizando un equipo Mini-PROTEAN 3 Cell de BioRad a 120 V durante 2 horas. El estándar utilizado en la electroforesis fue de biorad amplio rango (6.5-200 kDa).

### Producción de Hidrolizados

*Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup> exhibieron los más altos GH (aproximadamente del 8%) por lo que estas mismas enzimas fueron las seleccionadas para la preparación de hidrolizados con GH del 6 y 8%. Los hidrolizados se prepararon utilizando 850 g de macerado con 850 mL de agua destilada a 95 °C. Esta mezcla se mantuvo en calentamiento a 100 °C durante 15 min y enfrió a temperatura ambiente para su homogenización en un homogenizador de tejido Tizzumer Tekmar Modelo SDT 1810 (Tekmar Co. W. Germany) a una velocidad de 50,000 rpm durante 4 min a <10 °C. Las condiciones de hidrolisis fueron: pH 9.5 y 60 °C para hidrólisis con enzima *Protex 6L*<sup>®</sup>, y pH 8 y 50 °C para *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (pH ajustado con NaOH 2N), a concentraciones de 1% y 2% respectivamente. El tiempo de hidrolisis fue de 2 y 6 horas para *Protex 6L*<sup>®</sup>, y 0.5 y 4 horas para *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>, para obtener GH del 6 y 8% respectivamente. La reacción hidrolítica se detuvo mediante la inactivación por calentamiento a 85 °C durante 15 min y agitación ocasional. Los hidrolizados fueron enfriados a 4 °C, centrifugados a  $16,000 \times g$  por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado con papel Whatman No.4, para su posterior ultrafiltración como se describe en la siguiente sección. Se preparó una muestra control la cual corresponde a la fracción soluble del

homogenizado obtenido después de la inactivación térmica y centrifugación, sin incluir la adición e incubación con enzimas.

### Fraccionación de los Hidrolizados

El aislamiento y colección de diferentes fracciones de péptidos de los diferentes hidrolizados se llevó a cabo por la técnica de ultrafiltración. Para este fin se utilizó aproximadamente 1L de cada hidrolizado el cual fue secuencialmente ultrafiltrado utilizando membranas Millipore de 30, 10, 5 y 1 kDa (Millipore Corporation, Billerica, MA), para obtener 2 fracciones (<1 y 1-5 kDa) por cada hidrolizado producido. Durante la ultrafiltración se aplicaron presiones de 1-1.3 bares a flujo de 12 mL/min mediante el uso de una bomba peristáltica Manostat Preston Modelo #72-370-000 (Barnant Co.). Los ultrafiltrados generados fueron almacenados a -80 °C, para posteriormente ser liofilizados y almacenados en congelación hasta su utilización.

### Purificación de Péptidos por HPLC-Fase Reversa

La purificación de péptidos de las fracciones obtenidas por la técnica de ultrafiltración y las cuales exhibieron una mayor actividad biológica *in vitro* (actividad antihipertensiva y antioxidante), se llevó a cabo por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP, por sus siglas en inglés) en un equipo Hewlett Packard Modelo GmbH (Hewlett-Packard Co. Waldbrom, Germany), conectado a un detector de UV-Vis. La detección de péptidos se realizó a 210 nm y a una temperatura de 25 °C. Brevemente, las muestras fueron filtradas utilizando filtros de 0.22 µm para posteriormente tomar 90 µL de cada extracto acuoso e inyectarlo al HPLC-RP. Para la separación de los diferentes péptidos se utilizó una columna Zorbax 300SB-C18 StableBond Analytical (4.6 × 250 mm, 5 µm; Agilent, USA) eluyendo cada muestra a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min para un tiempo de corrida de 45 min. Se utilizó un gradiente lineal (de 5 - 60%) de fase móvil B (80% de acetonitrilo, 0.1% de

ácido trifluoroacético), y una fase móvil A (0.1% de ácido trifluoroacético en agua Milli-Q), respectivamente. Para concentrar cada fracción, el procedimiento de purificación fue repetido sucesivamente 20 veces, colectándose fracciones cada 2.5 min en un colector de fracciones marca Bio-Rad, el cual se conectó a la salida de la muestra del detector. Las fracciones fueron congeladas a -80 °C y los solventes fueron removidos mediante la liofilización de las fracciones colectadas. La muestra para actividad antioxidante fue inyectada a una concentración de 80 mg de NNP/mL (Protex 6L<sup>®</sup>, 6% GH, fracción 1-5 kDa) y la de actividad antihipertensiva a una concentración de 50 mg de NNP/mL (Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>, 8% GH, fracción <1 kDa).

Las fracciones que se utilizaron para la determinación de actividad inhibitoria de ECA fueron resuspendidas con 500 µL de buffer de borato de sodio 100 mM (pH 8.3) conteniendo NaCl 0.3 M. En el caso de las fracciones que se utilizaron para evaluar la actividad de captación de radicales DPPH, éstas fueron resuspendidas con 1.5 mL de agua Milli-Q.

La concentración de péptidos de las fracciones colectadas por HPLC-RP fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951), adaptado a micro-condiciones empleando un kit comercial de Bio-Rad (*DC Protein Assay Kit II*) y usando como estándar albúmina de suero bovino.

#### Determinación de Actividad Antihipertensiva mediante la Actividad Inhibitoria de ECA

La medición de actividad inhibitoria de ECA de las fracciones obtenidas por ultrafiltración (<1 y 1-5 kDa) y mediante HPLC-fase reversa, se llevó a cabo utilizando el método de Cushman y Cheung (1971) con algunas modificaciones. El reactivo hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu) fue empleado como sustrato y se disolvió en buffer de borato de sodio 100 mM (pH 8.3) conteniendo NaCl 0.3 M. Se tomaron 150 µL de la solución de Hip-His-Leu 5 mM y se mezclaron con 50 µL de la solución de péptidos y con 20 µL de solución de pulmón de conejo conteniendo 0.1 U/mL de ECA. Se utilizó una solución de 0.5 mg de NNP/mL para las fracciones obtenidas por ultrafiltración y diferente concentración de péptidos, en mg/mL, para las fracciones

obtenidas por HPLC-fase reversa. Después de haber incubado a 37 °C por 60 min en baño de agua, la reacción se finalizó mediante la adición de 250 µL de HCl 1N. El ácido hipúrico liberado fue extraído con 1.5 mL de acetato de etilo y su absorbancia determinada a 228 nm en un espectrofotómetro (modelo Cary BIO 50; Varian Instruments, La Joya, Ca, USA). El grado de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[(B - A) / (B - C)] \times 100$$

donde:

A = Densidad óptica en la presencia de ECA y componente inhibitorio de ECA

B = Densidad óptica sin el componente inhibitorio de ECA, y

C = Densidad óptica sin ECA.

La inhibición de ECA se expresó como la concentración de NNP o de péptidos necesaria para inhibir el 50% de la actividad de ECA (IC<sub>50</sub>). Estos valores se obtuvieron a partir de curvas de IC<sub>50</sub> (% de inhibición de ECA vs. concentración de péptidos) de cada una de las fracciones obtenidas por ultrafiltración y por HPLC-fase reversa.

#### Determinación de Actividad Antioxidante mediante el Ensayo de Captación de Radicales DPPH

La actividad de captar o atrapar radicales DPPH por las fracciones (<1 y 1-5 kDa) obtenidas mediante ultrafiltración y por HPLC-fase reversa, se determinó empleando el método de Bersuder *et al.* (1998). Las muestras disueltas en 500 µL de agua Milli-Q (diferentes concentraciones de las fracciones generadas por ultrafiltración, en mg de NNP/mL, y diferentes concentraciones en mg/mL, para las fracciones obtenidas por HPLC-fase reversa) fueron mezcladas con 500 µL de etanol al 99.5% y con 125 µL de una solución de DPPH (al 0.02% en etanol al 99.5%), en un vial de vidrio ámbar con capacidad de 4.5 mL. Las muestras fueron incubadas por 60 min en un cuarto oscuro a temperatura ambiente, y la reducción de radicales DPPH fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro (modelo Cary BIO 50; Varian Instruments, La Joya, Ca, USA). La actividad de captación de radicales libres se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de captación de radicales DPPH (\%)} = \left( \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right) \times 100$$

### Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), con un diseño completamente al azar. La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey-Kramer, a un nivel de significancia del 95%. El análisis se realizó con el programa estadístico NCSS 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la Materia Prima

La caracterización de la materia prima se realizó con el fin de determinar la posible variación que puede existir al muestrear subproductos del proceso de enlatado de sardina a diferentes días de procesamiento, especialmente en los valores de NNP y proteína. La tabla 1 muestra las diferencias por muestreo sobre la composición química del macerado de sardina Monterey. Los resultados mostraron una diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre el primer y segundo muestreo en los valores de proteína y nitrógeno no proteico, dos de los componentes de interés para este estudio; el tercer muestreo no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ) respecto a los otros. Los valores bajos de nitrógeno no proteico obtenidos en el presente estudio nos indican que la materia prima, tanto sardina como subproductos, fueron manejados en condiciones óptimas (tiempos y temperaturas), retardando con ello la actividad enzimática que se podría manifestar en un aumento en el contenido de nitrógeno no proteico. Estos resultados son mucho más bajos que los resultados obtenidos por Pacheco-Aguilar, *et al.* (2000), quienes manejaron a la misma sardina en óptimas condiciones postcosecha. Con esto se corrobora que aunque haya existido diferencia significativa entre los muestreos, las proteínas de la materia prima se encontraban muy poco hidrolizadas, pudiendo ser utilizadas todas las muestras para el estudio.

A pesar de que estadísticamente se observaron diferencias, desde el punto de vista tecnológico esta variación no es significativa y se puede considerar que se partió de una materia prima apta para el estudio.

**Tabla 1.** Composición química del macerado de subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) obtenido en los diferentes muestreos.

Componente (%)	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
Humedad	68.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	71.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	70.2 ± 0.1 <sup>c</sup>
Proteína	13.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	13.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Grasa	11.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.3 <sup>c</sup>
Cenizas	5.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.0 <sup>c</sup>
Nitrógeno no proteico *	2.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>ab</sup>

Los valores representan la media ± error estándar (n=8). Medias en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes (p≤0.05).

\* Los valores están reportados en mg de NNP/g de muestra (base húmeda).

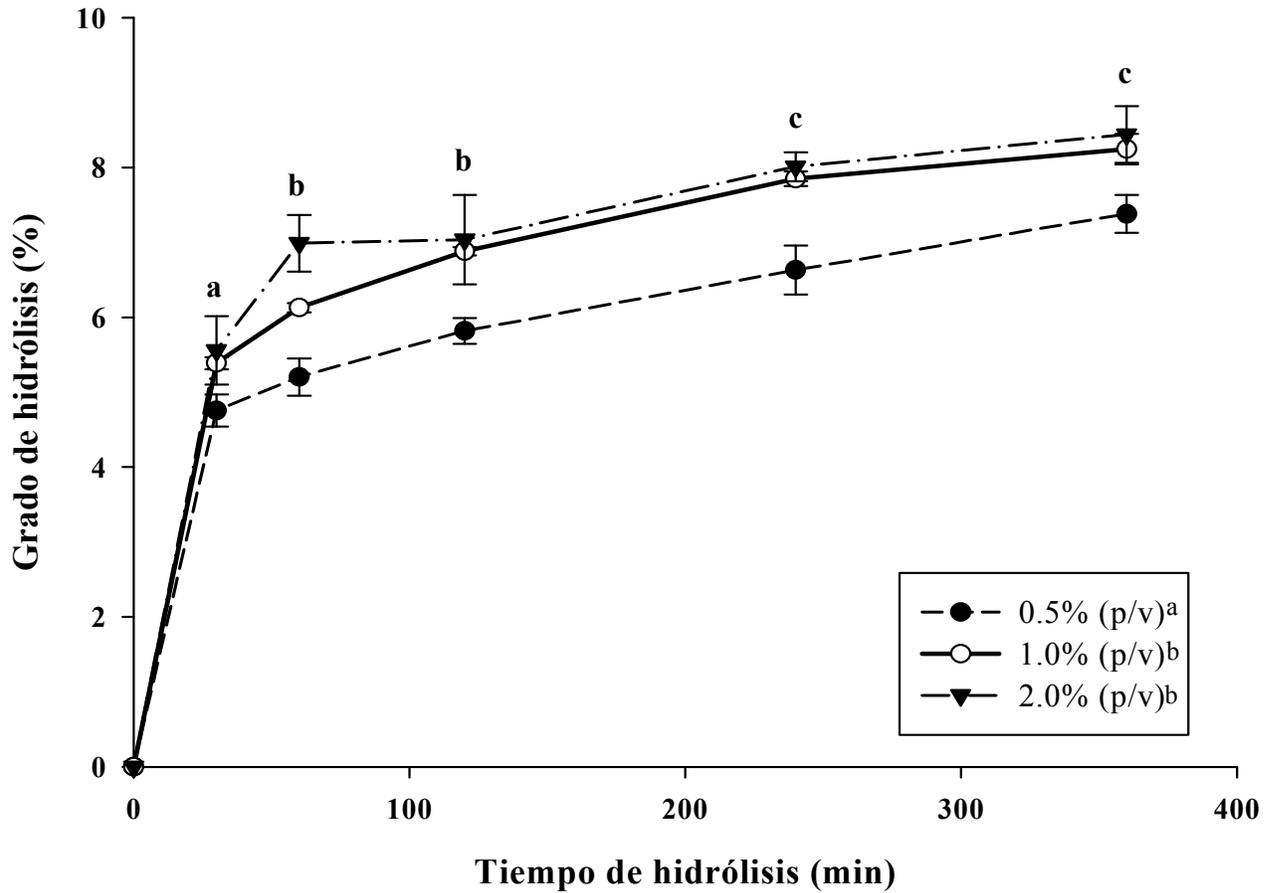
## Efecto del Tipo de Proteasa sobre el Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis es una medida del grado de degradación de una proteína y es el indicador más ampliamente utilizado para observar el efecto de enzimas sobre alguna proteína (Nielsen *et al.*, 2001). Durante la hidrólisis se generan péptidos de diferentes tamaños y pesos moleculares, así como diferentes secuencias peptídicas dependiendo de la especificidad enzimática (Klompong *et al.*, 2007). La actividad biológica de los hidrolizados proteicos depende del tipo de proteína, la especificidad de la enzima utilizada para la proteólisis, las condiciones utilizadas durante la hidrólisis y el grado de hidrólisis (Bougatef *et al.*, 2010). En el presente estudio, las enzimas comerciales *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>, *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Flavourzyme*<sup>®</sup> fueron usadas para la producción de hidrolizados proteicos de homogenados de cabezas y colas de sardina Monterey.

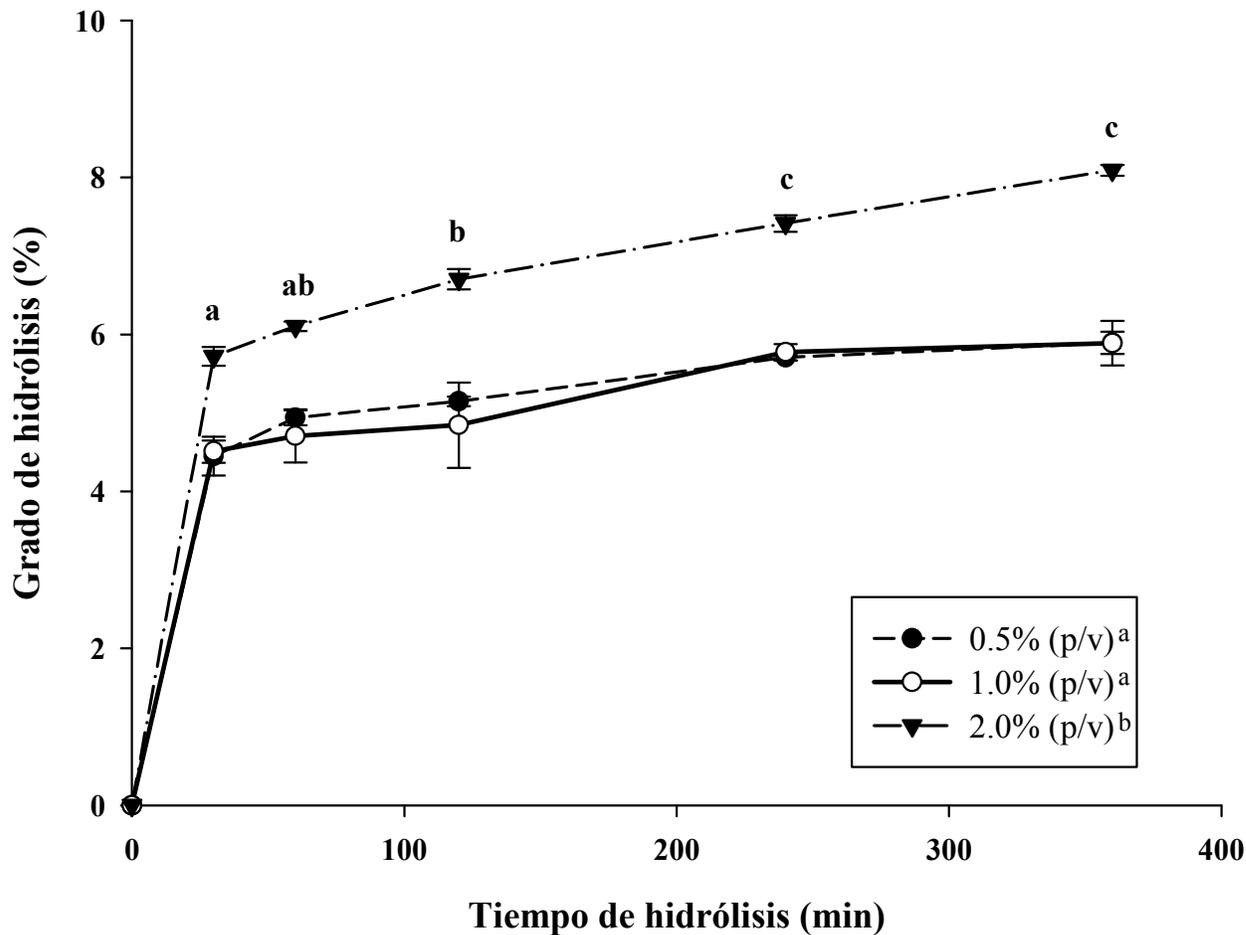
El homogenado de subproductos de sardina utilizado en el presente estudio, no fue previamente desgrasado, ya que en diversos estudios, como el de Hoyle y Merrit (1994), quienes trabajaron con muestras desgrasadas de arenque (*Clupea harengus*), y el de Klompong *et al.* (2007), los cuales trabajaron con músculo de jurel franja amarilla (*Selaroides leptolepis*), molido (mince) y desgrasado, encontraron que los hidrolizados proteicos de muestras desgrasadas exhibieron menores grados de hidrólisis que su contraparte. Los bajos grados de hidrólisis se deben a que las proteínas en muestras desgrasadas se encuentran agregadas, lo que ocasiona una disminución en la solubilidad de las mismas y como consecuencia, son menos susceptibles a la hidrólisis por la enzima adicionada (Benjakul y Morrissey, 1997).

Debido a que se ha hipotetizado que enzimas endógenas, como catepsinas en los residuos de músculo de pescado, promueven un efecto proteolítico adicional al de enzimas comerciales durante el proceso de hidrólisis (Mackie, 1982) se procedió a la inactivación de las enzimas presentes en el homogenado, aplicándosele un tratamiento térmico antes de efectuar la hidrólisis de sus proteínas a 100 °C por 15 min.

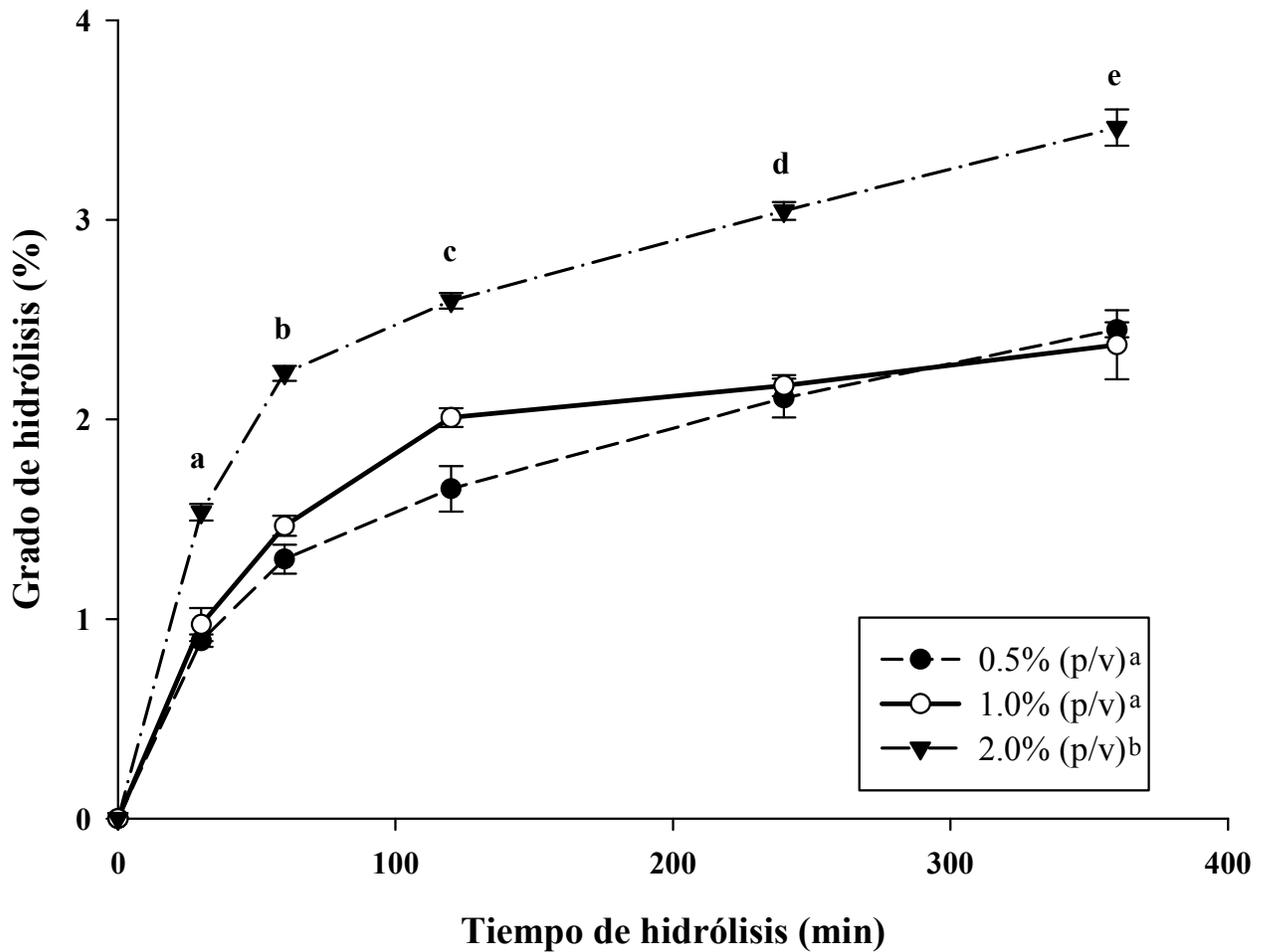
El progreso de la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey, después de 360 min de incubación, se muestran en las Figuras 3, 4 y 5. En ellas se puede observar que las enzimas *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (Figuras 3 y 4, respectivamente) alcanzaron un



**Figura 3.** Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) con *Protex 6L*<sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240, 360 min). Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el GH respecto a la concentración de enzima utilizada (literales en recuadro) y tiempo de hidrólisis.



**Figura 4.** Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240, 360 min). Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el GH respecto a la concentración de enzima utilizada (literales en recuadro) y tiempo de hidrólisis.



**Figura 5.** Incremento en el grado de hidrólisis (GH) durante la hidrólisis de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) con *Flavourzyme*<sup>®</sup> a diferente concentración (0.5, 1 y 2%) y tiempos de hidrólisis (0, 30, 60, 120, 240, 360 min). Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el GH respecto a la concentración de enzima utilizada (literales en recuadro) y tiempo de hidrólisis.

aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de grado de hidrólisis hasta los 240 min. Por otro lado, *Flavourzyme*<sup>®</sup> (Figura 5) mostró este incremento durante todo el tiempo de hidrólisis monitoreado. Además, se puede apreciar un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el grado de hidrólisis, dependiente de la enzima, a medida que se incrementa su concentración. Se observa el mayor incremento en la hidrólisis de las proteínas de subproductos de sardina Monterey en los primeros 60 min de reacción. Posteriormente, la velocidad de hidrólisis enzimática disminuyó hasta alcanzar casi un estado estacionario. Guerard *et al.* (2002) especularon que una reducción en la tasa de incremento del grado de hidrólisis, conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, se puede deber a la actividad enzimática limitada por la formación de productos de reacción. Además, la disminución de la velocidad de hidrólisis también puede ser debido a una reducción en la concentración del sustrato disponible para la hidrólisis

*Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> fueron las enzimas que exhibieron los más altos grados de hidrólisis (8.4 y 8.1%, respectivamente), y por lo tanto, fueron las más eficientes para hidrolizar las proteínas presentes en estos subproductos. En cambio, *Flavourzyme*<sup>®</sup> fue la enzima menos eficiente para hidrolizar las proteínas, ya que exhibió el menor grado de hidrólisis (3.5%) al final del estudio (tiempo de hidrólisis). Diferentes estudios han mostrado que en general, las proteasas alcalinas, como las del presente estudio, exhiben actividades más altas que la proteasa *Flavourzyme*<sup>®</sup> (Rebeca *et al.*, 1991; Klompong *et al.*, 2007).

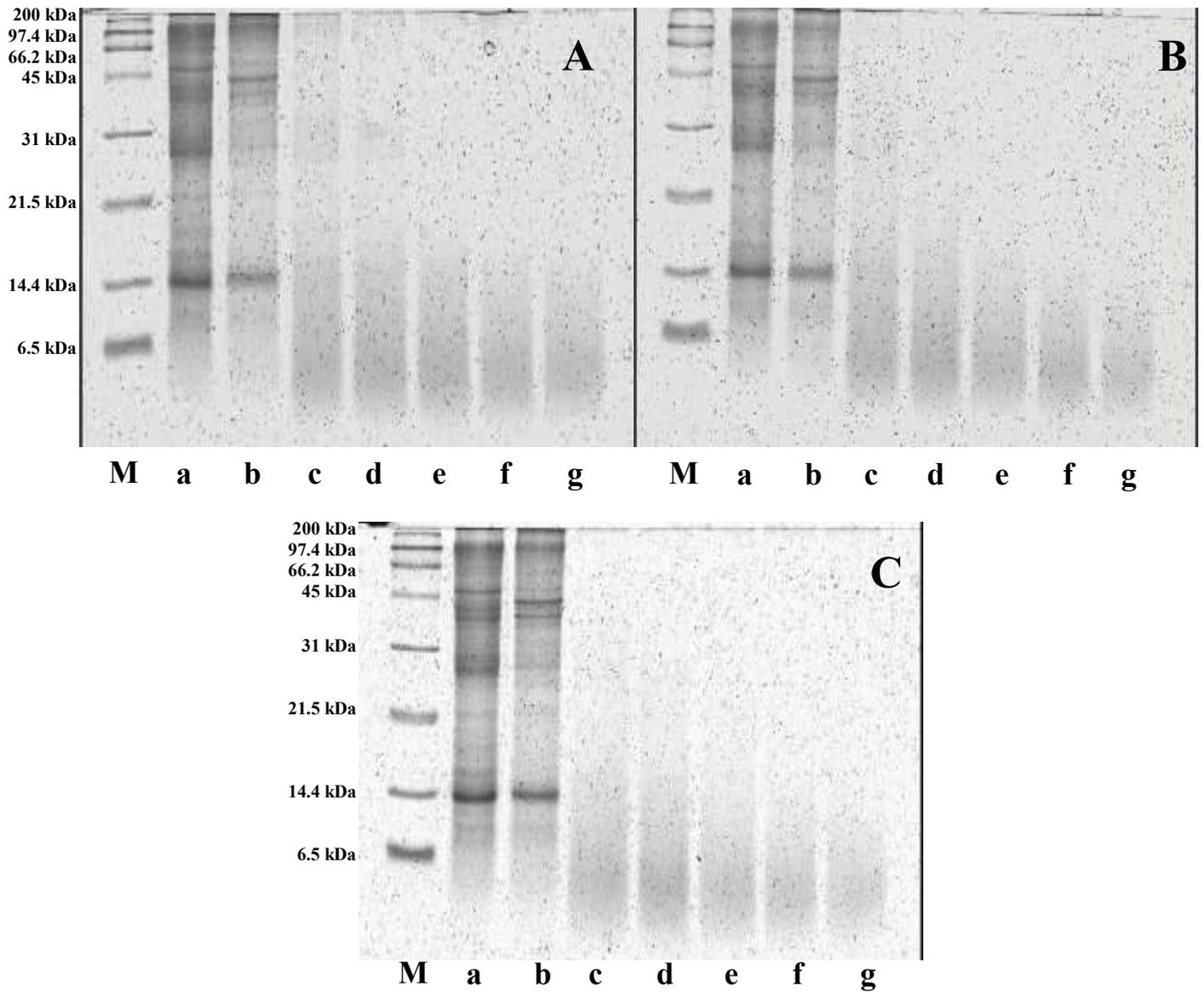
Curvas de hidrólisis similares a las obtenidas en el presente estudio han sido reportadas para hidrolizados de cabezas de salmón (Gbogouri *et al.*, 2004), filete molido de jurel franja amarilla (*Selaroides leptolepis*) (Klompong *et al.*, 2007), subproductos (cabezas y vísceras) de sardina (*Sardinella aurita*) (Bougatef *et al.*, 2008), músculo de *Mustelus mustelus* (Bougatef *et al.*, 2009), manto de calamar (*Sepia officinalis*) (Balti *et al.*, 2010), cabeza de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) (Ovissipour *et al.*, 2010), músculo y mince de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Kelfala *et al.*, 2010; Shamloo *et al.*, 2012), proteína de mejillón (*Mytilus edulis*) (Dai *et al.*, 2010), utilizando las mismas enzimas.

## Efecto del Tipo de Proteasa sobre la Degradación de Proteínas

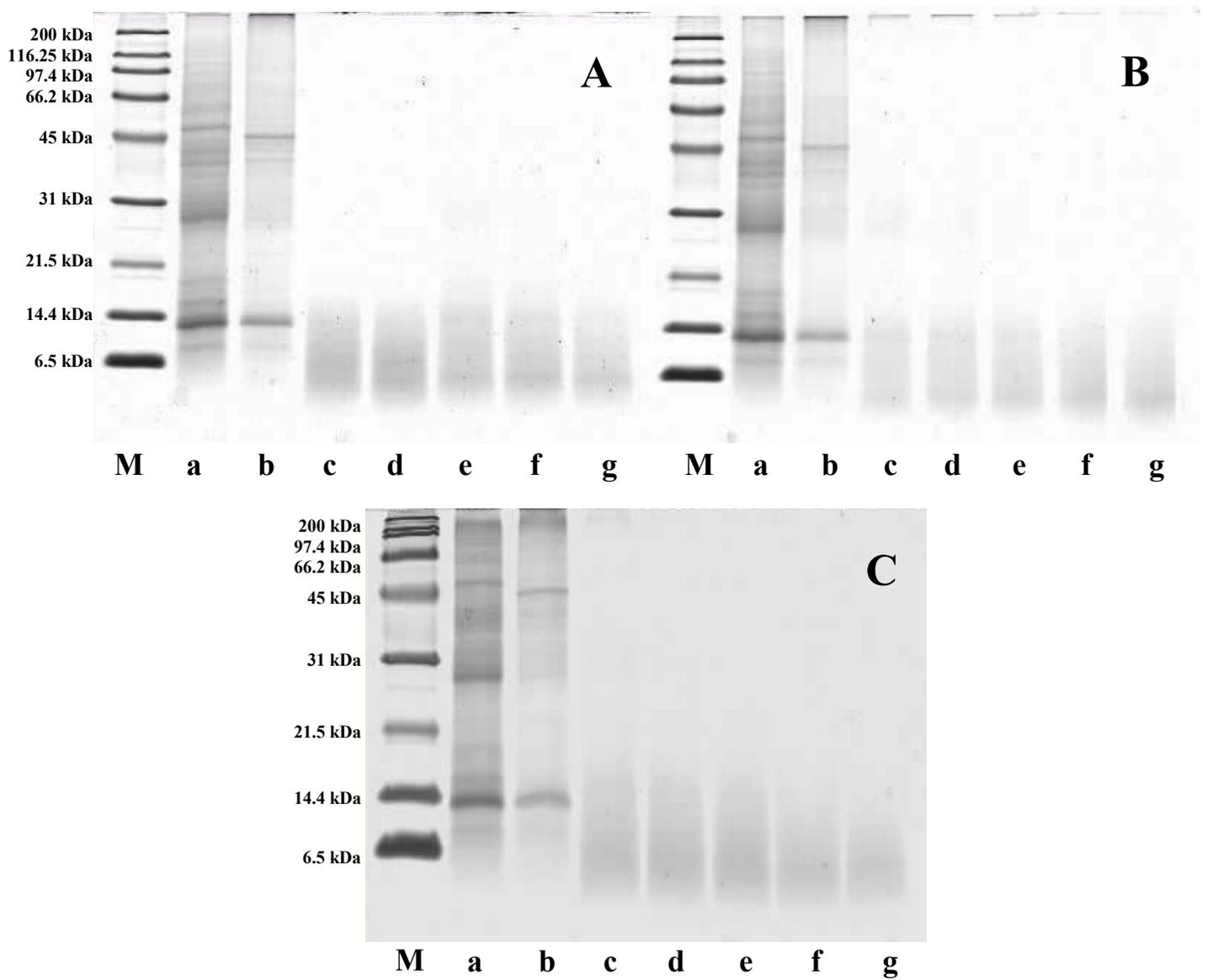
Las figuras 6 (A, B y C) y 7 (A, B y C) muestran los perfiles electroforéticos de hidrolizados de subproductos de sardina Monterey obtenidos mediante la adición de *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>. En ellas se observan cambios importantes en los hidrolizados con respecto al tiempo de hidrólisis. En los carriles señalados como a y b (homogenado y t=0, respectivamente), podemos observar bandas de proteínas que van desde los 14.4 a los 200 kDa, que corresponden a distintos tipos de proteínas presentes en los subproductos de sardina Monterey como proteínas sarcoplásmicas (mioglobina y hemoglobina), proteínas miofibrilares (actina y miosina), así como colágeno. A partir de los 30 min de hidrólisis se puede observar una disminución substancial (o desaparición) en la intensidad de la mayoría de las bandas proteicas por arriba de los 14 kDa, con la concomitante aparición de un barrido electroforético por debajo de los 14 kDa, el cual va disminuyendo gradualmente conforme transcurre el tiempo de hidrólisis. Lo anterior comprueba que las enzimas comerciales *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>, bajo las condiciones del presente estudio, fueron muy eficientes en la hidrólisis de este tipo de proteínas y por ende, en la producción de péptidos de bajo peso molecular, siendo éste uno de los objetivos del presente trabajo. Este mismo comportamiento fue observado por Shamloo *et al.* (2012) en la hidrólisis de músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) al utilizar *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>.

Por otro lado, la enzima *Flavourzyme*<sup>®</sup> no mostró el mismo efecto sobre las proteínas presentes en el homogenado de sardina Monterey (Figuras 8 A, B y C), ya que aunque se observó una disminución en la intensidad de las bandas presentes en el homogenado y un ligero incremento en el barrido electroforético por debajo de los 14 kDa conforme transcurre el tiempo de hidrólisis, estos cambios no fueron tan claros como en los observados por las otras 2 enzimas comerciales.

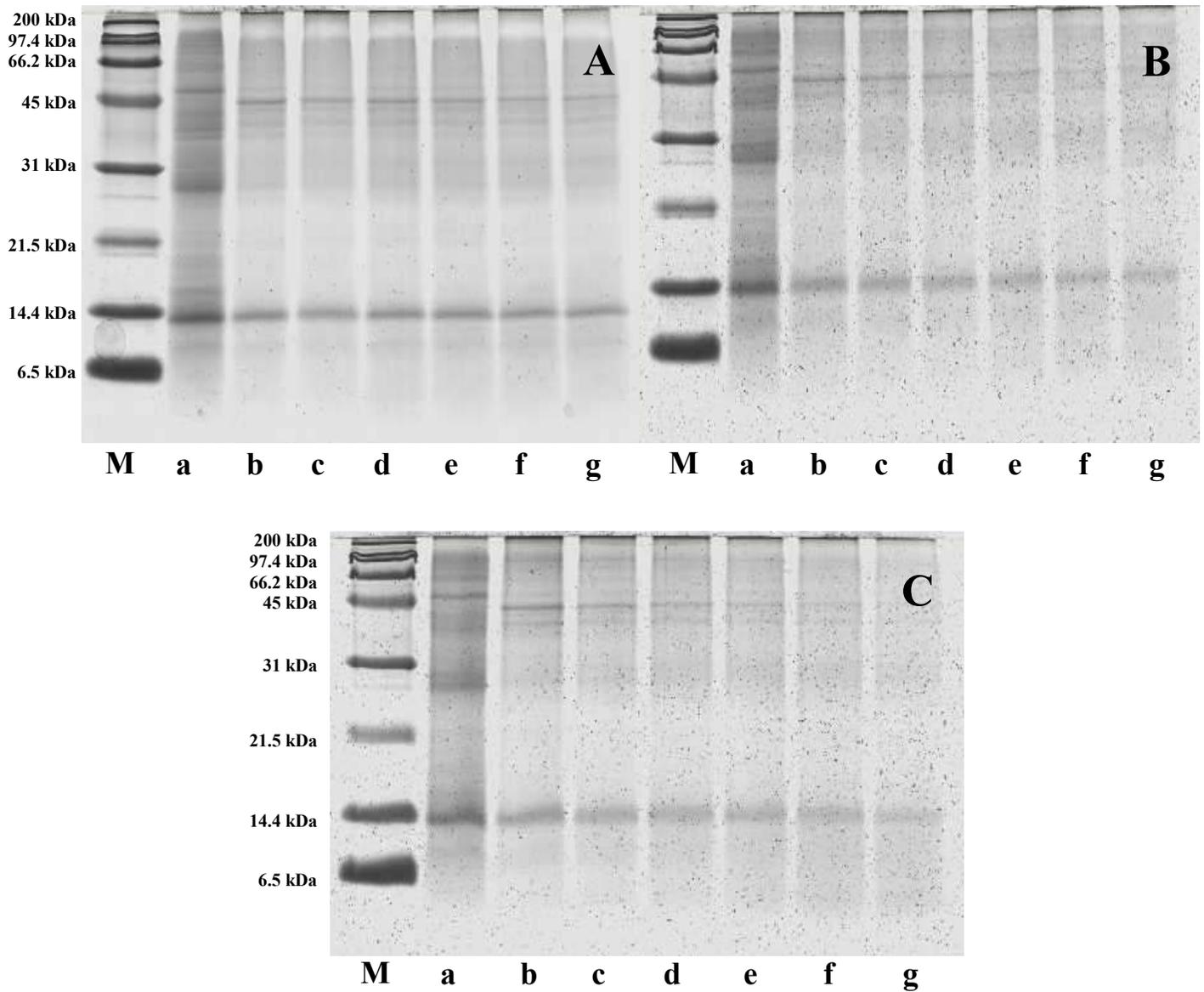
Con estos resultados se procedió a establecer el tipo de enzima y grado de hidrólisis a utilizar para la evaluación de las diferentes actividades biológicas, para lo cual se tomaron las enzimas *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> a dos GH (6 y 8%) cada una. Lo anterior para evaluar el efecto del GH sobre la actividad biológica *in vitro*, ya que



**Figura 6.** Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) durante la hidrólisis con *Protex 6L*<sup>®</sup>, a diferentes tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE). (M) marcador de peso molecular de amplio rango, (a) homogenado, (b)  $t=0$ , (c) 30 min, (d) 60 min, (e) 120 min, (f) 240 min, (g) 360 min. Concentraciones de *Protex 6L*<sup>®</sup>: (A) 0.5%, (B) 1%, (C) 2%.



**Figura 7.** Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) durante la hidrólisis con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>, a diferentes tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE). (M) marcador de peso molecular de amplio rango, (a) homogenado, (b) t=0, (c) 30 min, (d) 60 min, (e) 120 min, (f) 240 min, (g) 360 min. Concentraciones de *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>: (A) 0.5%, (B) 1%, (C) 2%.



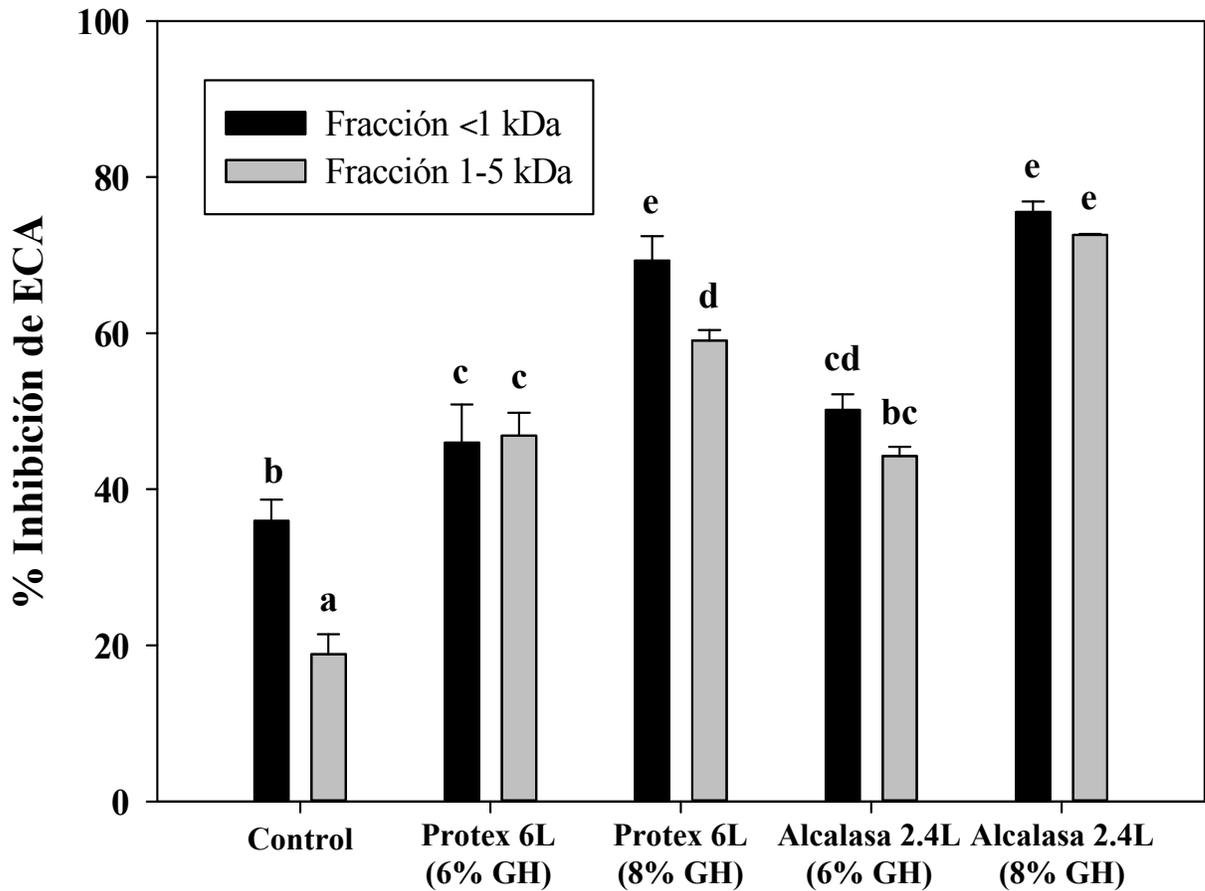
**Figura 8.** Perfiles electroforéticos de subproductos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) durante la hidrólisis con *Flavourzyme*<sup>®</sup>, a diferentes tiempos de hidrólisis (SDS-PAGE). (M) marcador de peso molecular de amplio rango, (a) homogenado, (b) t=0, (c) 30 min, (d) 60 min, (e) 120 min, (f) 240 min, (g) 360 min. Concentraciones de *Flavourzyme*<sup>®</sup>: (A) 0.5%, (B) 1%, (C) 2%.

dicha actividad depende no solo del tamaño del péptido sino también de su secuencia de aminoácidos.

### Actividad Antihipertensiva en Fracciones obtenidas por Ultrafiltración

La actividad de inhibición de ECA de fracciones peptídicas obtenidas de hidrolizados de subproductos de sardina Monterey se muestran en la Figura 9. Todas las fracciones peptídicas (<1 y 1-5 kDa) colectadas por ultrafiltración exhibieron actividad inhibitoria de la ECA. En general, las fracciones del control (muestra sin hidrolizar), mostraron las inhibiciones más bajas del estudio (<40%), mientras que las fracciones provenientes de la hidrólisis enzimática mostraron todas, valores superiores ( $p \leq 0.05$ ). Dentro de estas últimas fracciones, la correspondiente a <1 kDa obtenida con *Alcalasa 2.4 L*<sup>®</sup> con 8% de GH, expresó la más alta actividad inhibitoria de ECA ( $72.5 \pm 1.4\%$ ), mientras que la fracción de 1-5 kDa del control (muestra sin hidrolizar) exhibió la más baja actividad ( $18.9 \pm 2.5\%$ ). Los resultados indican que las fracciones de la muestra sin hidrolizar (control) contiene péptidos con actividad inhibitoria de la ECA, aunque en bajas concentraciones y/o no tan bioactivos como las secuencias peptídicas contenidas en las fracciones de los hidrolizados generados con las enzimas comerciales.

Los resultados anteriores se deben a que los ultrafiltrados fueron concentrados mediante liofilización de las fracciones para su evaluación de actividad antihipertensiva *in vitro*, ajustando la concentración de NNP en todas las fracciones. La recuperación de sólidos, después de ultrafiltrar y liofilizar las muestras, fue menor en las fracciones de la muestra sin hidrolizar (control), ya que no excedió el 0.09% (g de sólidos en la fracción/100 g de muestra); mientras que en las fracciones de los hidrolizados se alcanzaron porcentajes de recuperación entre 0.4 – 0.8%, siendo la fracción <1 kDa del hidrolizado producido con *Protex 6L*<sup>®</sup> con un 8% de GH, la que se recuperó en mayor cantidad. Además, en las fracciones <1 kDa y 1-5 kDa del control, el contenido de NNP fue de  $25.5 \pm 0.2\%$  y  $31.1 \pm 0.2\%$ , respectivamente, mientras que las fracciones de los hidrolizados mostraron contenidos en el rango de 55.9 a 62.9%. Todo lo anterior nos



**Figura 9.** Actividad inhibitoria de ECA de fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, posteriormente liofilizadas y ajustadas a una concentración de 0.5 mg de NNP/mL. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

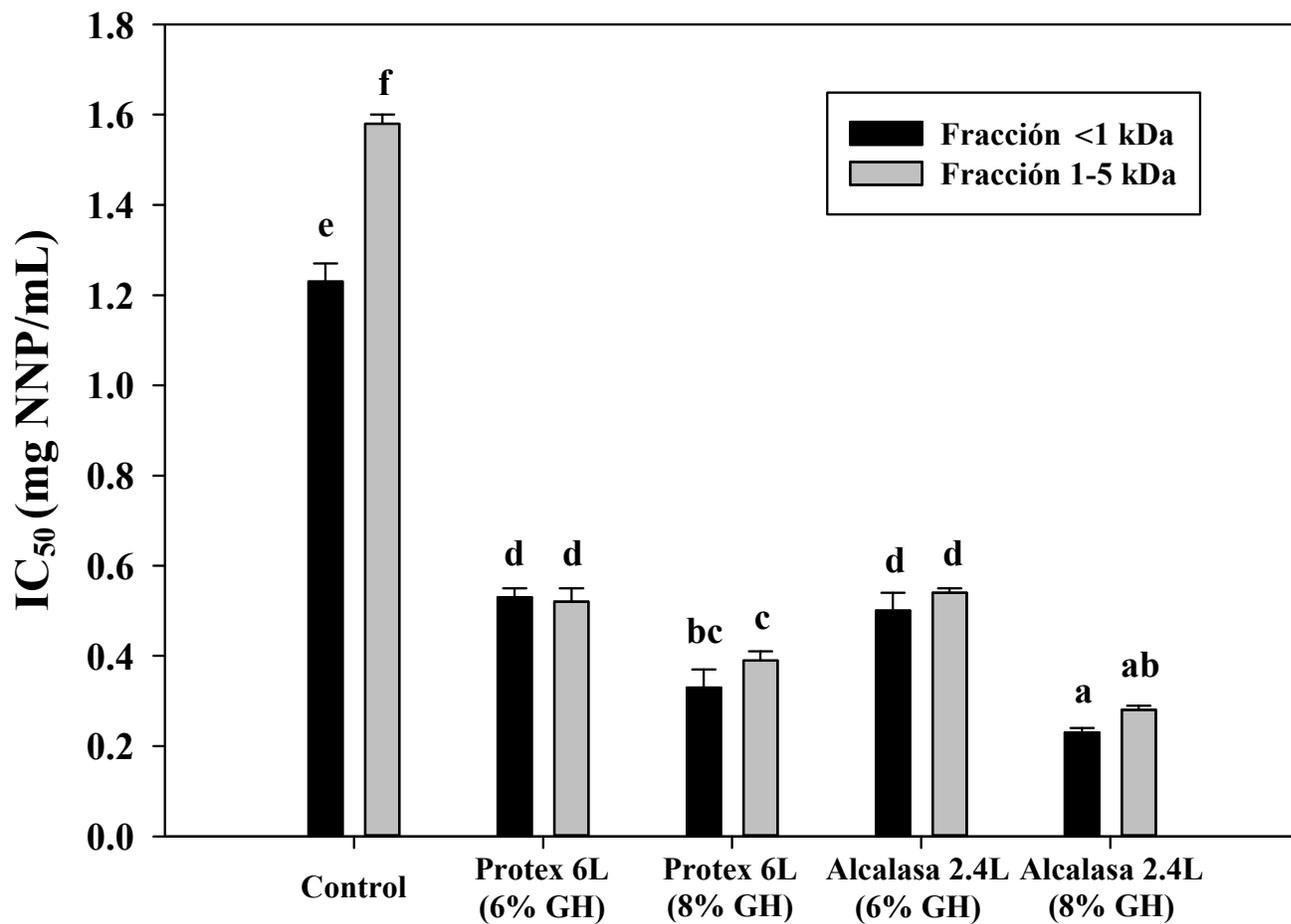
indica que en los hidrolizados se encontró mayor contenido de péptidos bioactivos que en la muestra sin hidrolizar.

En estudios efectuados por Lee *et al.* (2010), los cuales evaluaron 3 fracciones peptídicas (<1, 1-5 y 5-10 kDa) de un hidrolizado de músculo remanente del fileteado (subproducto) de atún generado por tratamiento con pepsina, obtuvieron porcentajes de actividad inhibitoria de ECA (de <80%) similares a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, cabe aclarar que estos investigadores utilizaron fracciones con mayor concentración (1 mg de péptidos/mL) que los del presente estudio (0.5 mg de NNP/mL), por lo que se podría suponer que los péptidos del presente estudio mostraron aún mejor actividad.

Bougatef *et al.* (2008) obtuvieron 8 fracciones peptídicas de un hidrolizado de subproductos (cabezas y vísceras) de sardina (*Sardinella aurita*) por tratamiento con un extracto crudo enzimático a partir de sardina (*Sardina pilchardus*). De las fracciones recolectadas, dos exhibieron los más altos porcentajes de actividad inhibitoria de ECA ( $76.6 \pm 1.25$  y  $74.5 \pm 1.33\%$ ), utilizando una concentración de 1 mg/mL, con valores similares a la fracción que exhibió la más alta actividad antihipertensiva en el presente estudio ( $72.5 \pm 1.4\%$  a 0.5 mg NNP/mL). Esta similitud de inhibición posiblemente se deba a la utilización de enzimas alcalino serin-proteasas en ambos estudios.

La mejor forma de determinar la bioactividad de fracciones peptídicas generadas es mediante la evaluación de la concentración de péptidos necesaria para inhibir al 50% la actividad de la ECA ( $IC_{50}$ ). A este respecto, la figura 10 muestra los resultados de  $IC_{50}$  obtenidos por las fracciones evaluadas y generadas bajo distintas condiciones de hidrólisis. La fracción que exhibió el valor más bajo de  $IC_{50}$  ( $0.2 \pm 0.0$  mg de NNP/mL), y por ende la mejor en inhibir a la ECA, fue la fracción <1 kDa del hidrolizado generado con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> con un 8% de GH. En contraparte, la fracción 1-5 kDa del hidrolizado control mostró el valor más alto de  $IC_{50}$  ( $1.6 \pm 0.0$  mg de NNP/mL).

El valor de  $IC_{50}$  de las fracciones peptídicas obtenidas de los hidrolizados producidos con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup> (0.2 – 0.5 mg de NNP/mL, incluyendo todos los hidrolizados obtenidos) resultaron más bajos que una de las fracciones obtenidas en el estudio de Bougatef *et al.* (2008) (0.81 mg/mL, utilizando fracciones <1 kDa de hidrolizados de vísceras y cabezas de sardina).

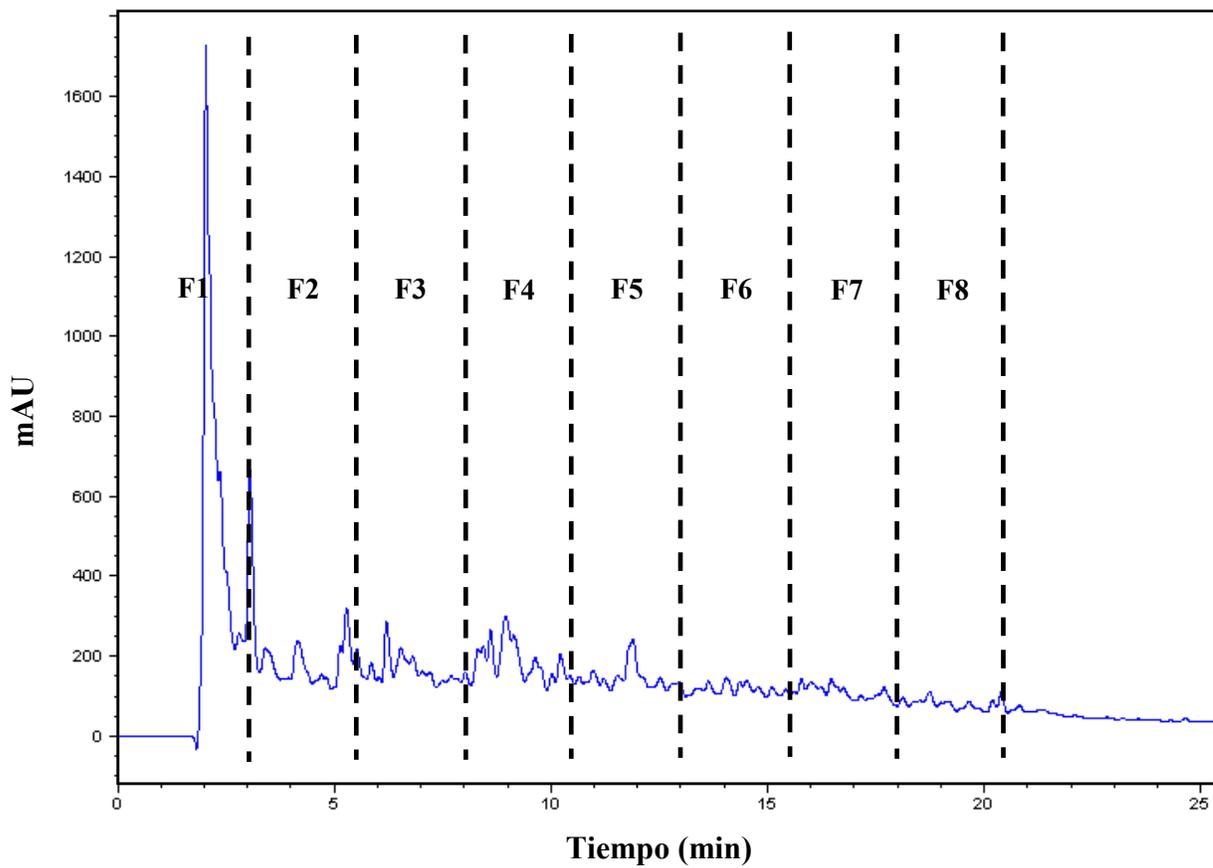


**Figura 10.** Valores de IC<sub>50</sub> correspondientes a la concentración necesaria de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, para inhibir al 50% la actividad de la ECA. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

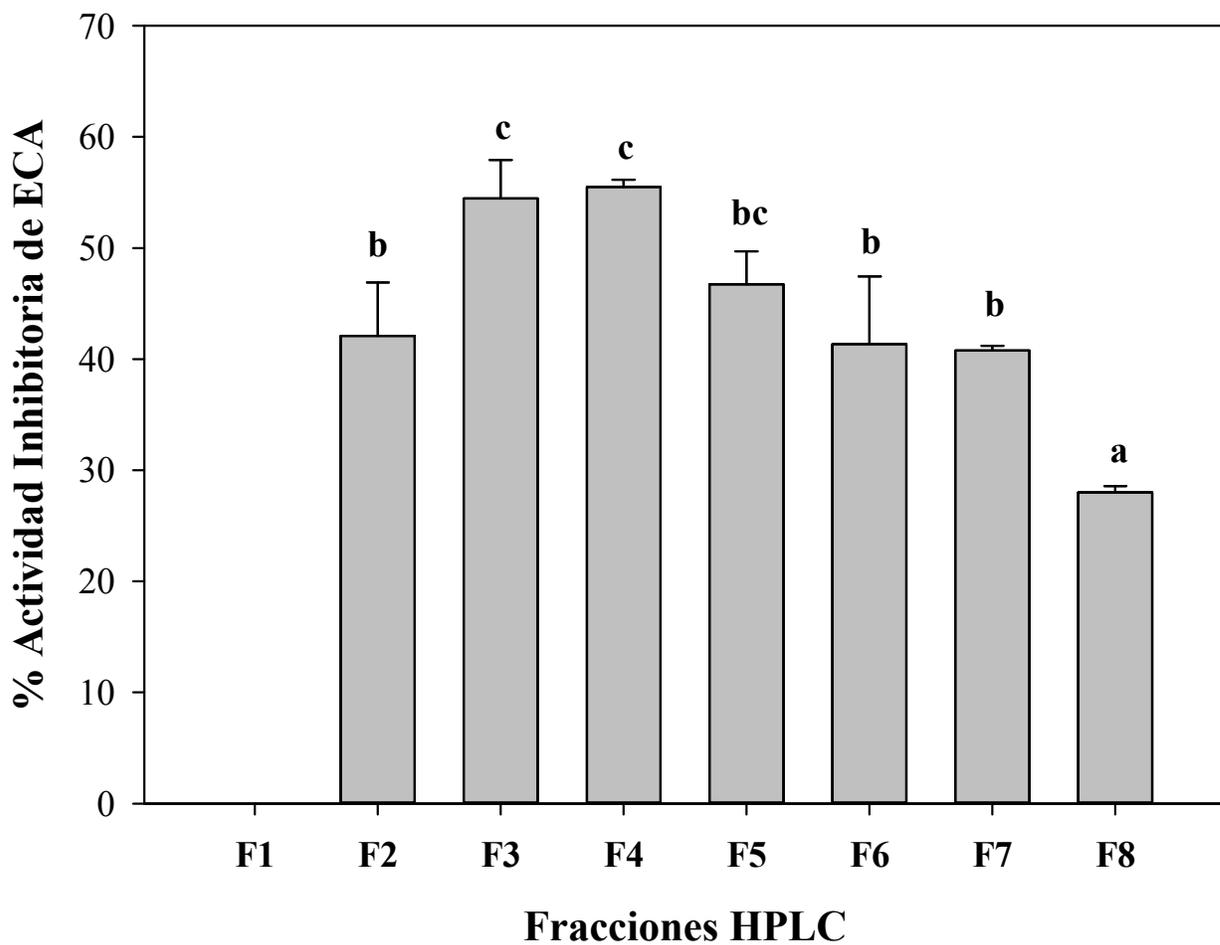
El que una fracción presente mayor  $IC_{50}$  puede deberse a la presencia de péptidos y polipéptidos de alto peso molecular en el hidrolizado, los cuales son menos activos que los péptidos de bajo peso molecular, ya que los primeros, con secuencias largas de aminoácidos, no pueden actuar de una manera tan efectiva como los péptidos de menor tamaño, aún si estos péptidos contienen en su estructura aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadena lateral ramificada) en las últimas 3 posiciones del extremo C-terminal (requerido para la unión con las 3 subunidades del sitio activo de la ECA).

#### Actividad Antihipertensiva de Fracciones Purificadas por HPLC-Fase Reversa

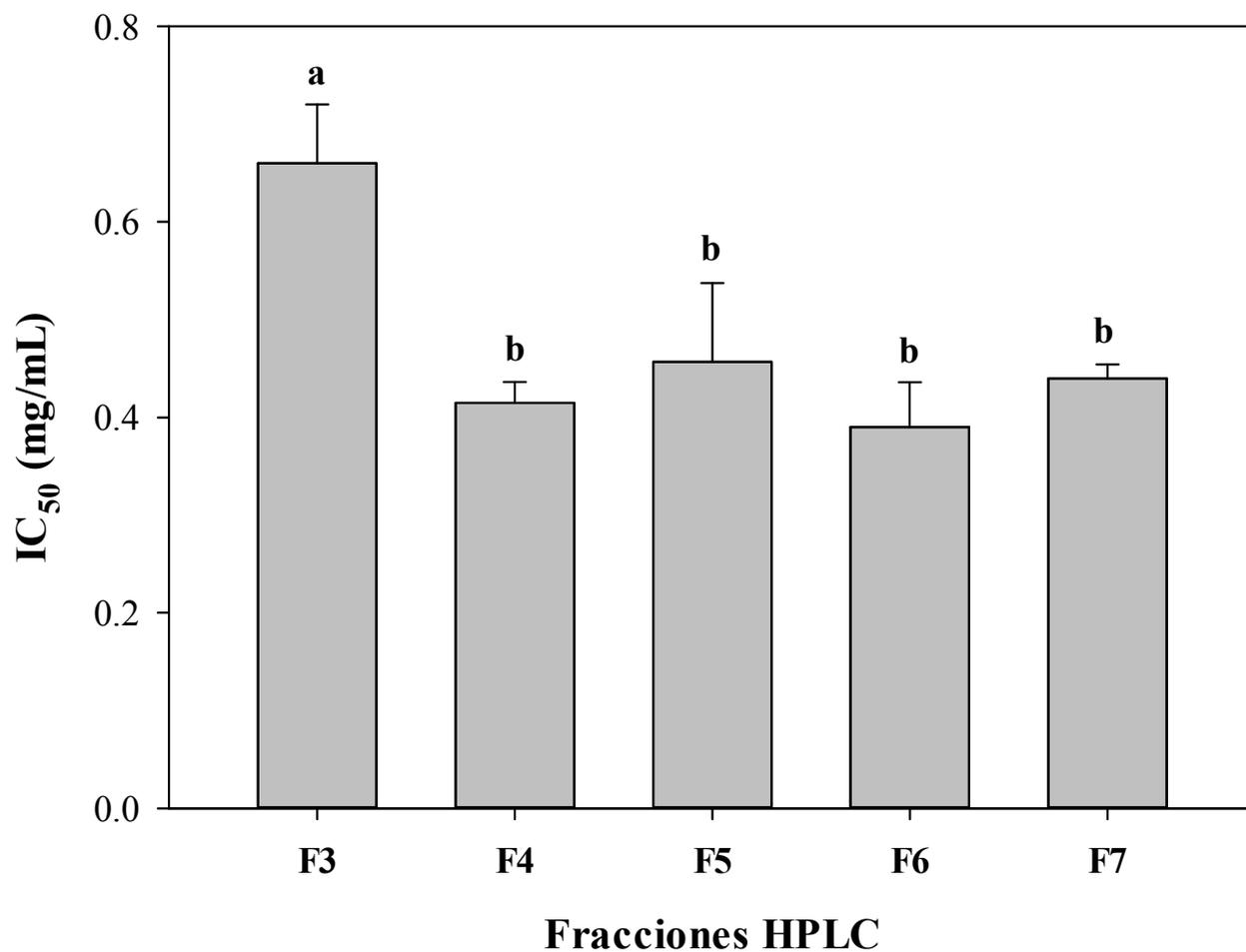
Los resultados generados indicaron que las fracciones de los hidrolizados producidos con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup> obtenidas por ultrafiltración, contienen péptidos inhibidores de la ECA. Así, con el fin de evaluar las contribuciones de los péptidos de bajo peso molecular presentes en la fracción <1 kDa del hidrolizado producido con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (8% GH), la cual exhibió un menor  $IC_{50}$  y por ende, una mayor actividad antihipertensiva *in vitro*, ésta fue posteriormente analizada por HPLC-fase reversa. Se colectaron 8 fracciones (F1 – F8, Figura 11) cada 2.5 min, las cuales se liofilizaron para finalmente medirse su actividad inhibitoria de ECA. Como se muestra en la figura 12, todas las fracciones exhibieron actividad inhibitoria de ECA, excepto la fracción F1. Por otro lado, la fracción F8 fue la que expresó el menor ( $p \leq 0.05$ ) % de actividad inhibitoria de ECA ( $28.0 \pm 0.6\%$ ), a una concentración de 0.2 mg/mL. De las 8 fracciones, la fracción F4 mostró la actividad inhibitoria de ECA más potente ( $55.5 \pm 0.7\%$ ), seguida por la fracción F3 ( $54.4 \pm 3.5\%$ ); sin embargo, estas fracciones exhibieron esas actividades a diferentes concentraciones (0.5 y 0.7 mg/mL, respectivamente). Debido a que las fracciones peptídicas colectadas mostraron diferente concentración de péptidos, la mejor manera de demostrar su actividad inhibitoria es obteniendo sus  $IC_{50}$  (Figura 13). Cabe mencionar que no se generó el valor de  $IC_{50}$  de la fracción F8, ya que la concentración que se obtuvo por HPLC-fase reversa, no fue suficiente para inhibir al 50% la actividad de la ECA. En cambio, la fracción F2 (la cual exhibió una actividad inhibitoria de ECA de  $42.1 \pm 4.8\%$ , a una concentración de 0.9



**Figura 11.** Patrón de elución por HPLC-fase reversa de la fracción <1 kDa del hidrolizado producido con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (8% GH), en una columna Zorbax 300SB-C18 StableBond Analytical. Velocidad de flujo, 1.5 mL/min; absorbancia monitoreada a 210 nm. Las fracciones fueron colectadas cada 2.5 min.



**Figura 12.** Actividad inhibitoria de ECA de fracciones peptídicas obtenidas por HPLC-fase reversa. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 13.** Valores de IC<sub>50</sub> correspondientes a la concentración necesaria necesaria de las fracciones obtenidas por HPLC-fase reversa, para inhibir al 50% la actividad de la ECA. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

mg/mL), aunque suficiente en concentración, se decidió no obtener este valor, ya que se requeriría de demasiada muestra (aproximadamente 1 mg/mL) para alcanzar su  $IC_{50}$ , lo anterior tomando en cuenta las concentraciones requeridas por el resto de las fracciones (<0.7 mg/mL).

Gu *et al.* (2011) evaluaron actividad antihipertensiva de péptidos generados a partir de la hidrólisis del colágeno extraído de la piel de salmón del Atlántico. De 11 fracciones peptídicas colectadas, 2 expresaron la más alta actividad inhibitoria de ECA, con porcentajes de inhibición de  $91.10 \pm 1.34$  y  $80.51 \pm 1.32\%$ , a una concentración de 1mg/mL. En comparación a los resultados generados en el presente estudio, estas fracciones mostraron más alta actividad inhibitoria de ECA, aunque a mayor concentración. No cabe duda de que el tipo de muestra del cual se obtienen los péptidos es un factor importante para mostrar dicha actividad inhibitoria. Además, varios estudios concuerdan que los péptidos generados a partir de la hidrólisis del colágeno o gelatina de la piel de varias especies marinas, muestran una alta actividad inhibitoria de ECA, por la presencia de aminoácidos que se encuentran en mayor proporción, como prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). Como se mencionó en los antecedentes, el sitio activo de la ECA tiene mayor preferencia por este tipo de aminoácidos, por lo que la presencia de éstos en la secuencia peptídica favorece su unión con la enzima.

Los valores de  $IC_{50}$  de las fracciones obtenidas por HPLC-fase reversa, se muestran en la figura 13. Los resultados indicaron que la fracción F3 expresó el valor más alto ( $p \leq 0.05$ ) de  $IC_{50}$ , con un valor de  $0.7 \pm 0.1$  mg/mL, mientras que el resto de las fracciones presentaron valores <0.5 mg/mL ( $p > 0.05$ ), siendo éstas las mejores en inhibir a la ECA.

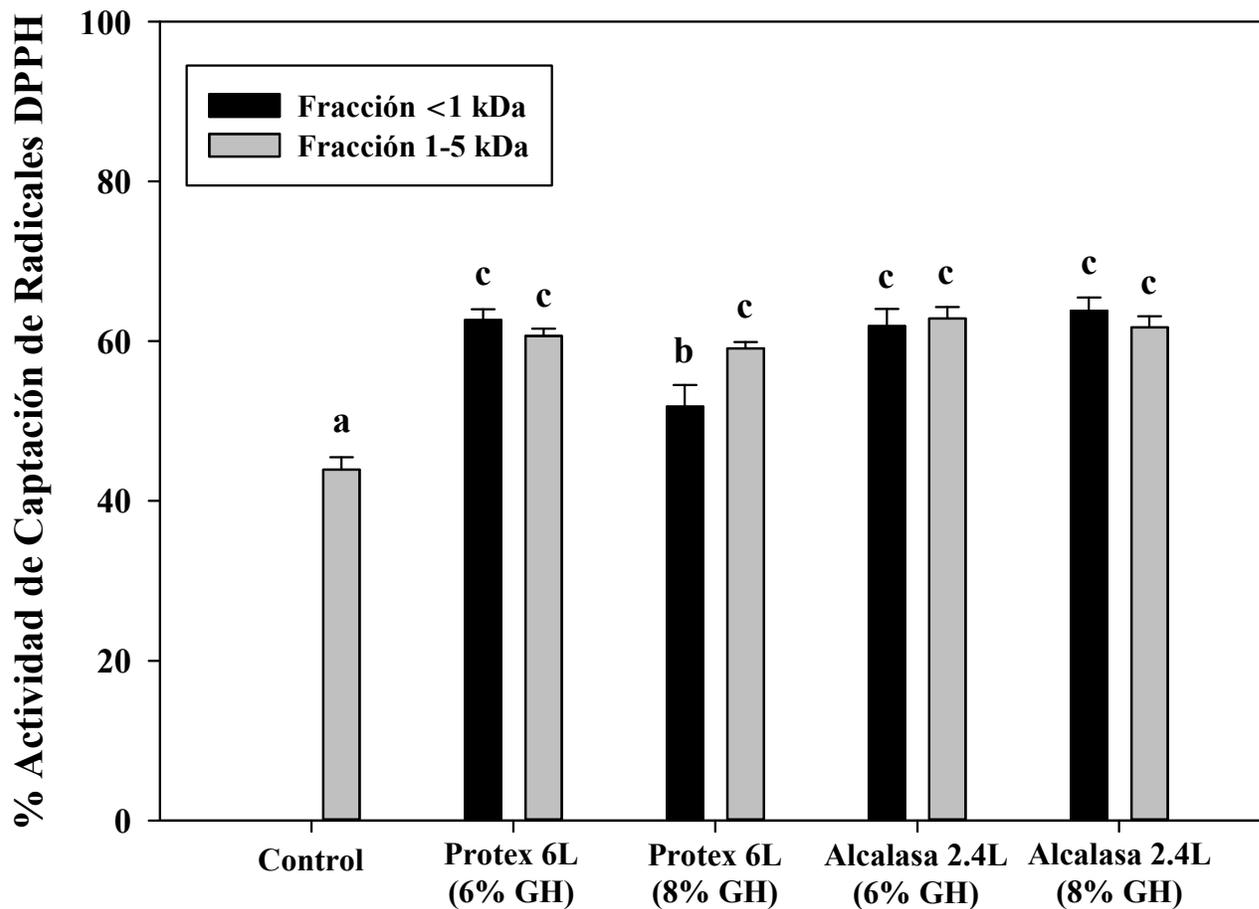
Diferentes estudios han mostrado valores de  $IC_{50}$  en un amplio rango de valores, que van desde los 13  $\mu$ g/mL hasta valores menores a 1 mg/mL, observándose que a mayores pasos de purificación de las fracciones peptídicas, menores resultan los valores de  $IC_{50}$ . (Byun y Kim, 2001; Wijesekara *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011).

## Actividad Antioxidante en Fracciones obtenidas por Ultrafiltración

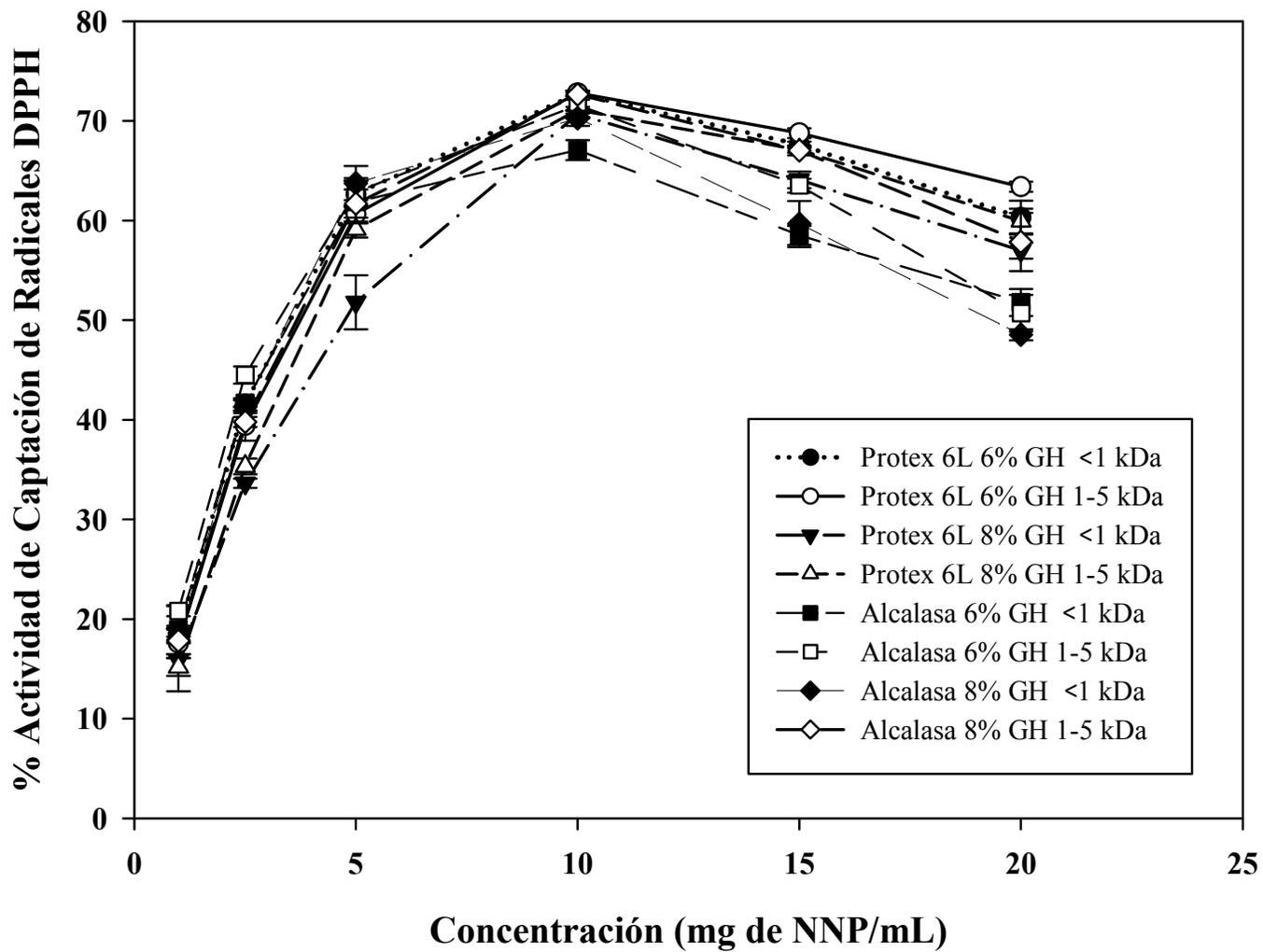
Se ha demostrado que la actividad antioxidante de una proteína se puede incrementar mediante su hidrólisis con ciertas enzimas, ya que algunos de los péptidos o fracciones generadas pueden poseer una potencial actividad antioxidante (Chen *et al.*, 1995).

La actividad antioxidante de una sustancia puede ser identificada con mayor precisión mediante la evaluación de la actividad de captación de radicales libres generados en sistemas oxidativos (Je *et al.*, 2007). Por lo tanto, las fracciones (<1 y 1-5 kDa) obtenidas por ultrafiltración fueron evaluadas en su capacidad de captación de radicales DPPH, a una concentración de 5 mg de NNP/mL (figura 14). Los resultados indicaron que la fracción 1-5 kDa del hidrolizado control exhibió la más baja actividad ( $p \leq 0.05$ ) de captación de radicales DPPH ( $43.9 \pm 1.6\%$ ). Por otro lado, la fracción <1 kDa del hidrolizado control no mostró actividad antioxidante. Sin embargo, las fracciones producidas con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup>, a un 6 y 8% de GH, mostraron las más altas actividades de captación de radicales DPPH (excepto la fracción <1 kDa del hidrolizado generado con *Protex 6L*<sup>®</sup> a un 8% de GH), no exhibiendo diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ). Los resultados generados en la presente investigación fueron superiores a los obtenidos por Bougateg *et al.* (2010), quienes obtuvieron una fracción a partir de subproductos (cabezas y vísceras) de sardina (*Sardinella aurita*), la cual presentó el mayor porcentaje de captación de radicales DPPH (48% a 1 mg de péptidos/mL). Estas diferencias quizás se deban a que en el presente estudio se evaluó esta actividad a una mayor concentración.

Para observar la concentración máxima de péptidos con la cual obtener la mayor actividad antioxidante, se evaluaron las fracciones peptídicas obtenidas a partir de los hidrolizados con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> y *Protex 6L*<sup>®</sup> a diferentes concentraciones (1 – 20 mg de NNP/mL; figura 15). Los resultados claramente indican que todas las fracciones exhibieron un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) de la actividad antioxidante en el rango de 1 - 10 mg de NNP/mL y una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) de la misma a concentraciones >10 mg de NNP/mL. Sin embargo, la fracción 1-5 kDa del hidrolizado generado con *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% GH) mostró el más alto % de captación de radicales



**Figura 14.** Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, liofilizadas y evaluadas a una concentración de 5 mg de NNP/mL. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 15.** Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración, posteriormente liofilizadas y evaluadas a diferentes concentraciones. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado.

DPPH ( $72.8 \pm 0.3\%$ ) a una concentración de 10 mg de NNP/mL. Además, esta fracción disminuyó en menor proporción su actividad antioxidante a concentraciones mayores ( $63.4 \pm 0.5\%$ ). Por lo tanto, se consideró a esta fracción peptídica como la que exhibió una mayor capacidad antioxidante.

En un estudio realizado por Bougatef *et al.* (2009), en el cual hidrolizaron proteínas del músculo de *Mustelus mustelus* con proteasas gastrointestinales, se obtuvo un hidrolizado el cual expresó una actividad antioxidante similar a la del presente estudio (76.7% a 3 mg/mL vs. 72.8% a 10 mg de NNP/mL, respectivamente). Cabe mencionar que los hidrolizados (a comparación de las fracciones peptídicas) pueden llegar a exhibir mayor actividad antioxidante debido a que pueden contener péptidos y polipéptidos de cadena larga con aminoácidos aromáticos o donadores de electrones. En otras palabras, para ejercer esta actividad, no importa que tan grande o pequeño sea el péptido/polipeptido, sino el tipo de aminoácidos, y su cantidad, que conforman la secuencia peptídica. Lo anterior se corrobora con el estudio de Wu *et al.* (2003), quienes encontraron que la fracción peptídica de aproximadamente 1.4 kDa obtenida a partir de un hidrolizado de macarela (*Scomber austriasicus*), presentó una actividad antioxidante *in vitro* más fuerte que aquellas fracciones peptídicas con pesos moleculares entre 200-900 Da.

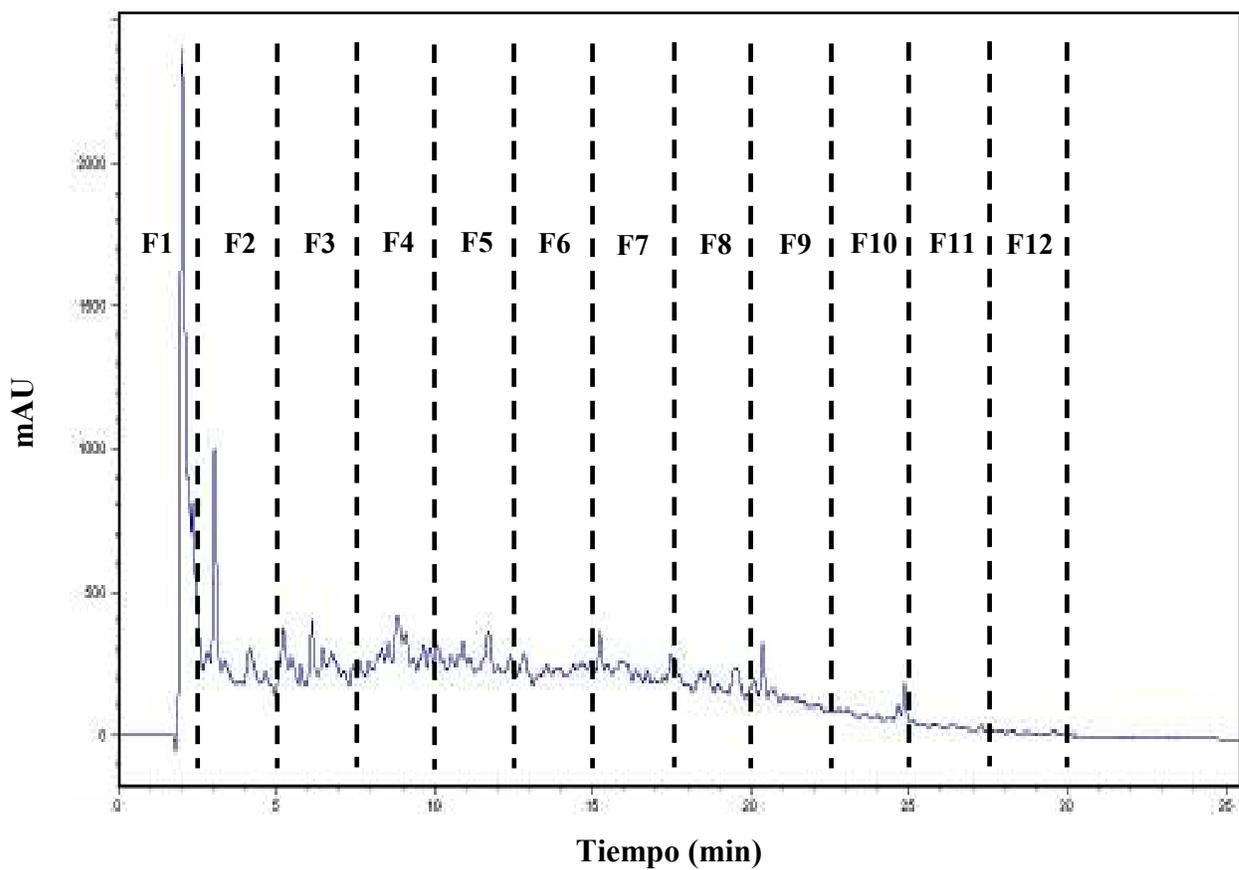
En el presente estudio se observó una disminución en la actividad antioxidante a concentraciones >10 mg de NNP/mL. Lo anterior probablemente se deba a que existe una saturación de la reacción péptido-DPPH a esas concentraciones; esto es, los radicales del péptido que se están generando al estabilizar el radical DPPH, están siendo estabilizados por ellos mismos, en vez de reaccionar con los radicales DPPH. Esto por el impedimento estérico que se genera al tener altas concentraciones de péptidos en relación a la concentración de radical DPPH.

Hasta el momento, los resultados del presente estudio sugieren que las fracciones peptídicas obtenidas a partir de los hidrolizados generados con *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup>, contienen péptidos que pueden ser donadores de electrones y reaccionar con los radicales libres lipídicos, para convertirlos en compuestos más estables y por consiguiente, terminar la reacción en cadena que se genera por estos radicales libres.

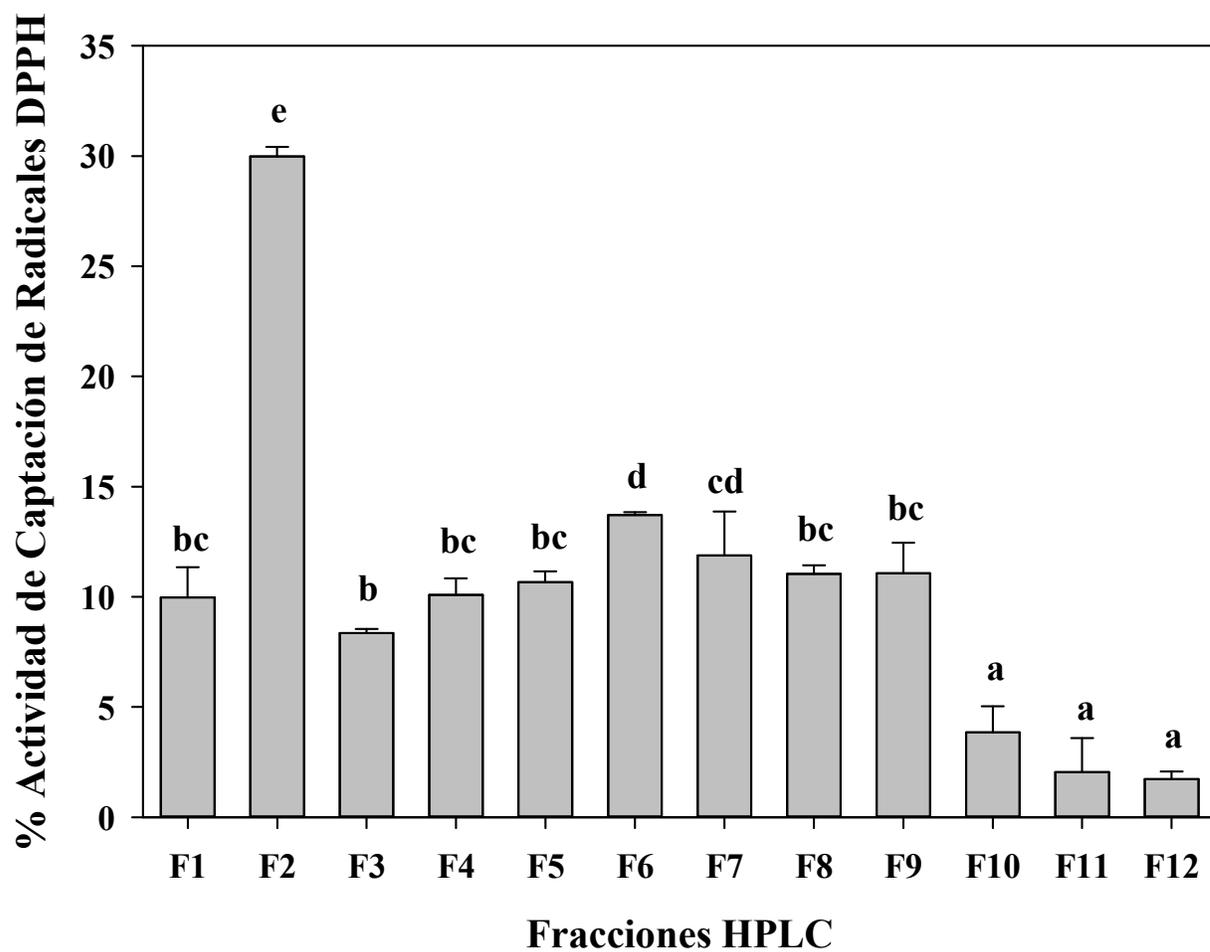
## Actividad Antioxidante de Fracciones Purificadas por HPLC-Fase Reversa

Para purificar más los péptidos con actividad antioxidante, la fracción 1-5 kDa del hidrolizado producido con *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% GH), fue utilizada para ser separada por HPLC-fase reversa y fraccionada en 12 subfracciones (F1 – F12 en Figura 16). Cada una de las fracciones fue concentrada mediante liofilización, para posteriormente evaluar su actividad de captación de radicales DPPH. Como se puede observar en la figura 17, todas las fracciones mostraron diversos porcentajes de dicha actividad, siendo la fracción F2 la que expresó la mayor ( $p \leq 0.05$ ) actividad ( $30.0 \pm 0.4\%$  a  $1.1 \text{ mg/mL}$ ), seguida por la fracción F6 que exhibió una actividad del  $13.7 \pm 0.1\%$  a una concentración de  $1.0 \text{ mg/mL}$ . Comparando estos resultados con los del estudio de Bougateg *et al.* (2010) en subproductos de sardina (*Sardinella aurita*), los autores obtuvieron una subfracción que presentó la mayor actividad de captación de radicales DPPH, de  $63.0 \pm 1.6\%$  a una concentración de  $150 \text{ } \mu\text{g/mL}$ , valor muy superior que la fracción F2 mostrada en el presente estudio. A pesar de que las muestras de ambos estudios fueron similares, esto es, provinieron de hidrolizados de subproductos de sardina, aunque de diferente especie, la discrepancia en los resultados parece indicar que el tipo de proteasa influyó en la producción de péptidos con actividad antioxidante, ya que en nuestro estudio se usó *Protex 6L*<sup>®</sup>, mientras que en el estudio de Bougateg *et al.* (2010) se utilizó un extracto crudo de enzimas provenientes de *Sardina pilchardus*. La especificidad de las enzimas contenidas en el extracto crudo tal vez generó secuencias peptídicas con mayor capacidad antioxidante, es decir, con mayor contenido de aminoácidos donadores de átomos de hidrógeno o donadores de electrones.

En el estudio de Ngo *et al.* (2011), purificaron las fracciones por HPLC-fase reversa. Todas las fracciones purificadas exhibieron actividad de captación de radicales DPPH, con actividades en el rango de 25% a 45% a  $0.1 \text{ mg/mL}$ , mientras que en el presente estudio se obtuvo un rango de actividades del 2 al 30.0% (con la mayoría dentro de actividades  $<15\%$ ) a concentraciones mayores de péptidos. Obviamente, los resultados varían de acuerdo al tipo de muestra a hidrolizar, de la enzima utilizada, así como de las purificaciones realizadas.



**Figura 16.** Patrón de elución por HPLC-fase reversa de la fracción 1-5 kDa del hidrolizado producido con *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% GH), en una columna Zorbax 300SB-C18 StableBond Analytical. Velocidad de flujo, 1.5 mL/min; absorbancia monitoreada a 210 nm. Las fracciones fueron colectadas cada 2.5 min.



**Figura 17.** Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas por HPLC-fase reversa. Las barras de error muestran la desviación estándar relativa. Los valores representan la media de los análisis por triplicado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente estudio, las enzimas *Protex 6L*<sup>®</sup> y *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> mostraron ser las proteasas comerciales más eficientes en la producción de péptidos de bajo peso molecular a partir de los hidrolizados de subproductos (cabezas y colas) del enlatado de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). Todas las fracciones peptídicas evaluadas exhibieron tanto actividad antioxidante como antihipertensiva en ensayos *in vitro*. La bioactividad no dependió del grado de hidrólisis. Al parecer dependió de la composición de aminoácidos, de la cantidad y de la posición de éstos en las secuencias peptídicas en cada una de las fracciones colectadas en la presente investigación, así como también de la enzima utilizada para la producción de los hidrolizados proteicos. La fracción <1 kDa del hidrolizado producido con *Alcalasa 2.4L*<sup>®</sup> (8% de GH) exhibió el menor IC<sub>50</sub>, y por ende la mayor actividad inhibitoria de ECA *in vitro*. En cambio, la fracción 1-5 kDa del hidrolizado generado con *Protex 6L*<sup>®</sup> (6% de GH) mostró la mayor actividad de captación de radicales DPPH. Los péptidos de menor peso molecular (<1 kDa) provenientes de hidrolizados con un alto grado de hidrólisis, exhiben mayor actividad inhibitoria de ECA que aquellos péptidos con peso molecular <1 kDa obtenidos a bajo grado de hidrólisis. Un comportamiento similar es observado para los péptidos >1 kDa, los cuales muestran un mayor actividad inhibitoria de la ECA a mayor GH.

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que los subproductos del proceso de enlatado de sardina Monterey (colas y cabezas) tienen el potencial para ser utilizados como materia prima para la producción de hidrolizados proteicos con actividad antioxidante y antihipertensiva, mediante la aplicación de tecnología convencional. El uso de estos subproductos por parte de la industria enlatadora de sardina traería grandes beneficios, tanto para la empresa como para la sociedad, ya que le generaría altos ingresos a la industria al transformar estos

subproductos, que actualmente se destinan para la producción de harina de pescado (para consumo animal), en un producto de valor agregado como serían los péptidos bioactivos.

Se espera que este estudio contribuya al desarrollo de investigación aplicada, y en un futuro, al desarrollo tecnológico a través de la posible aplicación potencial de los péptidos bioactivos contenidos en las fracciones que exhibieron actividad biológica. Estas fracciones podrían ser útiles para aplicaciones en la industria alimentaria (productos nutraceúticos) y/o en la industria farmacéutica.

Estudios posteriores sobre la caracterización de los péptidos contenidos en las fracciones que exhibieron alta bioactividad permitirá determinar la importancia del tamaño del péptido, composición de aminoácidos, posición de los aminoácidos en la secuencia peptídica, así como el tipo de enzima utilizada en la producción de los hidrolizados proteicos, los cuales determinaron su actividad biológica *in vitro*. Además, es necesaria su evaluación *in vivo*, con el fin de determinar su biodisponibilidad.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Agric Food Chem.* 27:1256-1262.
- Aguilar, M. I. 2004. HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 251:3-22.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., y Gómez-Guillén, M. C. 2011. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology.* 44:407-413.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., y Montero, P. 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry.* 125:334-341.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereaus, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., y Montero, P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International.* 44:1044-1051.
- Aluko, R. E., y Monu, E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science.* 68:1254–1258.
- Amarowicz, R., y Shahidi, F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chemistry.* 58:355–359.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis.* 14th. ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arason, S., Karlsdottir, M., Valsdottir, T., Slizyte, R., Rustad, T., Falch, E., Eysturskard, J., y Jakobsen, G. 2009. Maximum resource utilisation – Value added fish by-products. Accesado en Septiembre de 2012: <http://nordicinnovation.org/Publications/maximum-resource-utilisation-value-added-fish-by-products/>

- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., e Itoh, M. 2001. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*. 57:319–324.
- Balti, R., Nedjar-Arroume, N., Bougateg, A., Guillochon, D., y Nasri, M. 2010. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Research International*. 43:1136-1143.
- Benjakul, S., y Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:3423-3430.
- Bersuder, P., Hole, M., y Smith, G. 1998. Antioxidants from a heated histidine–glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*. 75:181–187.
- Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A., e Isidra, R. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*. 17:42–49.
- Bougateg, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., y Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 114:1198–1205.
- Bougateg, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., y Nasri, M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118:559–565.
- Bougateg, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., y Nasri, M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*. 111:350–356.

- Byun, H. G., y Kim, S. K. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*. 36:1155–1162.
- Byun, H. G., y Kim, S. K. 2002. Structure and Activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Alaskan Pollack Skin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 35(2):239-243.
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L., y Navarrete-Del Toro, M.A. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*. 85:343–350.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. *J. Agric. Food Chem.* 43:574-578.
- Chen, J. Y., Lin, W. J., y Lin, T. L. 2009. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. *Peptides*. 30:1636–1642.
- Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y., y Xia, W. 2012. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*. 33:52-58.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., y Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci*. 66:1219-1227.
- CONAPESCA. 2011. Accesado en Octubre de 2012: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_estadistico\\_de\\_acuacultura\\_y\\_pesca\\_2011](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_estadistico_de_acuacultura_y_pesca_2011)
- Cushman, D. W., y Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637-1648.
- Dai, Z. Y., Zhang, Y. P, Zhang, H., y Lu, Y. B. 2010. Preparation and Characterization of Mussel (*Mytilus edulis*) Protein Hydrolysates with Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Biochemistry*. 1-9.

- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., y Shahidi, F. 2005. Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4303–4310.
- DFO. 2004. Pacific Sardine DFO Can. Sci. Advis. Sec. Stock Status Report 2004/037.
- Díaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., y Keaney, J. F. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*. 337:408–416.
- Doode, S. 1992. La industria sardinera ante las nuevas condiciones de mercado. En: La industria alimentaria en Sonora. Reestructuración y retos ante la apertura comercial. CIAD, A. C., (Ed.). pp. 213-242.
- Galindo-Cortes, G., De Anda-Montañez, J. A., Arreguín-Sánchez, F., Salas, S., y Balart, E. F. 2010. How do environmental factor affect the stock-recruitment relationship? The case of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) of the northeastern Pacific Ocean. *Fisheries Research*. 102:173-183.
- García-Rodríguez, F. J., García-Gasca, S. A., De La Cruz-Agüero, J., y Cota-Gómez, V. 2011. A study of the population structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) in Mexico based on morphometric and genetic analyses. *Fisheries Research*. 107:169-176.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., y Parmentier, M. 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *J. Food Sci*. 69(8):6125-622.
- Ghassem, M., Arihara, K., Babji, A. S., Said, M., e Ibrahim, S. 2011. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food Chemistry*. 129:1770-1777.
- Ghosh, R. 2003. Ultrafiltration: An overview. In R. Ghosh (Ed.). *Protein bioseparation using ultrafiltration: Theory, applications and new developments* (pp. 13–15). London: Imperial College Press.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., y Mulligan, C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy fermented food. *Foods Research International*. 37:123–131.
- Gildberg, A., Arnesen, J. A., Sæther, B., Rauø, J., Stenberg, E. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in a hydrolysate of proteins from Northern

- shrimp (*Pandalus borealis*) and identification of two novel inhibitory tri-peptides. *Process Biochemistry*. 46:2205-2009.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. y Di Cagno, R. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42:223-239.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., y Montero, M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25:1813-1827.
- Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., y Montero, P. 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Transworld Research Network (ed.). Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*. Kerala, India. 89-115.
- Gu, R. Z., Li, C. Y., Liu, W. Y., Yi, W. X., y Cai, M. Y. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) skin. *Food Research International*. 44:1536-1540.
- Guérard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, F., Le-Delesir, R., Jaouen, P., y Bourseau, P. 2010. Recent development of marine ingredients for food and nutraceuticals applications: a review. *J. Sci. Hal. Aquat*. 2:21-27.
- Guerard, F., Guimas, L., y Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Molec Catal. B, Enzymatic*. 19–20: 489–498.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar, M. C., y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165:23-35.
- Hoyle, N., y Merrit, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 59:76-79.
- Hsu, K. C. 2010. Purification of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*. 122:42-48.
- Hsu, K. C., Cheng, M. L., y Hwang, J. S. 2007. Hydrolysates from Tuna Cooking Juice as an Anti-hypertensive Agent. *Journal of Food and Drug Analysis*. 15(2):169-173.

- Huang, D., Ou, B., y Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 53:1841–56.
- Hwang, J. S. 2010. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. *Food Research International.* 43:902-906.
- Hwang, J. S., y Ko, W. C. 2004. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Protein Hydrolysates from Tuna Broth. *Journal of Food and Drug Analysis.* 12(3):232-237.
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., y Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. *Food and Chemical Toxicology.* 24:1099-1102.
- Iwaniak, A., y Minkiewicz, P. 2007. Proteins as the Source of Physiologically and Functionally Active Peptides. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6(3):5-15.
- Jacobsen, C.F., Léonis, J., Linderstrøm-Lang, K., y Ottesen, M. 1957. The pH-stat and its use in biochemistry. *Meth Biochem Anal.* 4:171-210.
- Janson, J. C., y Ryden, L. 1998. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications.* 2nd ed. Wiley Inc.
- Je, J. Y., Park, P. J., Jung, W. K., y Kim, S. K. 2005. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry.* 90:809–814.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., y Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry.* 42:840-846.
- Jeon, Y. J., y Kim, S. K. 2002. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in an ultrafiltration membrane reactor system. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 12:503–507.
- Jeong, D. W., Shin, D. S., Ahn, C. W., Song, I. S., y Lee, H. J. 2007. Expression of antihypertensive peptide, His-His-Leu, as tandem repeats in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol.* 17(6):952-959.

- Jimsheena, V. K., y Gowda, L. R. 2010. Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: Structure-activity relationship. *Peptides*. 31:1165-1176.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., y Kim, S. K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur Food Res Technol*. 219:20-26.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., He, J. 2005. Global Burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*. 365:217-223.
- Kelfala, M. B., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T., y Xia, W. 2010. Functionality and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci*. 11:1951-1869.
- Kim, H. J., Park, K. H., Shin, J. H., Lee, J. S., Heu, M. S., Lee, D. H., y Kim, J. S. 2011. Fractionation and Characterization of Fractions with High Antioxidative Activity from the Gelatin Hydrolysates of Korean *Rockfish schlegelii* Skin. *Fish Aquat Sci*. 14(3):168-173.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., y Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Allaska Pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:1984–1989.
- Kim, S. K., y Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*. 39:383–393
- Kim, S. Y., Je, J. Y., y Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18:31-38.
- Kim, S. Y., Kim, S. H., y Bin, S. K. 2003. Partial Purification and Characterization of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from Squid Ink. *Agric. Chem. Biotechnol*. 46(3):122-123.
- Kitts, D. D., y Weiler K. 2003. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16):1309-1323.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., y Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally

- (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry. 102:1317–1327.
- Korhonen, H., y Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. 16:945–960
- Korhonen, H., y Pihlanto-Leppälä, A. 2003. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. Aust J Dairy Technol. 5:129-134.
- Kuba, M., Tana, C., Tawata, S., y Yasuda, M. 2005. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. Process Biochemistry. 40:2191–2196.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., y Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry 85:633–640.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. Nature. 227:680-685.
- Lahogue, V., Réhel, K., Taupin, L., Haras, D., y Allaupe, P. 2010. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Food Chemistry. 118:870-875.
- Lee, Y. G., Kim, J. Y., Lee, K. W., Kim, K. H., y Lee, H. J. 2004. Peptides from anchovy sauce induce apoptosis in a human lymphoma cell (U937) through the increase of caspase-3 and -8 activities. Annals of the New York Academy of Sciences. 1010: 399–404.
- Lee, J. K., Jeon, J. K., y Byun, H. G. 2011. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. Food Chemistry. 125:495-499.
- Lee, S. H., Qian, Z. J., y Kim, S. K. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry. 118:96-102.
- Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H., y Le, G. W. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. J. Pharmaceut. Biomed. 37:219-224.
- Lin, C. C., y Liang, J. H. 2002. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. Journal of Food Science. 67:530–533.

- Lin, Y. J., Le, G. W., Wang, J. Y., Li, Y. X., Shi, Y. H., y Sun, J. 2010. Antioxidative Peptides Derived from Enzyme Hydrolysis of Bone Collagen after Microwave Assisted Acid Pre-Treatment and Nitrogen Protection. *Int. J. Mol Sci.* 11:4297-4308.
- López-Fandiño, R., Otte, J. y van Camp, J. 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. *Int. Dairy J.*16:1277-1293.
- Mackie, I. M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry.* 20:26-30.
- Margot, A., Flaschel, E., y Renken, A. 1994. Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Proc Biochem* 29(4):257-262.
- Martínez-Porchas, M., Hernández-Rodríguez, M., y Bückle-Ramírez, L. F. 2009. Thermal behavior of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) acclimated to different thermal cycles. *Journal of Thermal Biology.* 34:372-376.
- Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., y Osajima, Y. 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology Biochemistry.* 58:2244-2245.
- Matsui, T., Matsufuji, H., y Osajima, Y. 1992. Colorimetric measurement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:517-518.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., y Kim, S. K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences.* 77: 2166–2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., y Kim, S. K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 53:581–587.
- Muzaifa, M., Safriani, N., y Fahrizad, Z. 2012. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation.* 5(1):36-39.

- Najafian, L., y Babji, A. S. 2012. A review of fish – derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*. 33:178-185.
- Ngo, D. H., Qian, z. J., Ryu, B., Park, J. W., y Kim, S. K. 2010. *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*. 12:107-117.
- Ngo, D. H., Ryu, B., Vo, T. S., Himaya, S. W., Wijesekara, I., y Kim, S. K. 2011. Free radical scavenging and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49:1110-1116.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., y Dambmann, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5):642-646.
- Nii, Y., Fukuta, K., Yoshimoto, R., Sakai, K., y Ogawa, T. 2008. Determination of Antihypertensive Peptides from an Izumi Shrimp Hydrolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 72(3)861–864.
- Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluvec, J., Weaver, E. R. and Kocy, O. 1971. Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*, isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*. 10:4033–4039.
- Ondetti, M. A., y Cushman, D. W. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem*. 51:283-308.
- Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., y Takashi, K. 2006. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *International Journal of Food Science and Technology*. 41:383-386.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., y Motamedzadegan, A. 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. 2:87-95.
- Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., and Robles-Burgueño, M. R. 2000. Postmortem biochemical and functional characteristic of monterey sardine muscle stored at 0° C. *J. Food Sci*. 65(1):40-47.

- Pacheco-Aguilar R., Mazorra-Manzano M. A., y Ramirez-Suarez, J. C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*. 109(4): 782-789
- Pan, D., Guo, H., Zhao, B., y Cao, J. 2011. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21:3898-3904.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Cabo, M. L., Herrera, J. J., y Bernardez, M. 2004. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 84(1):83-88.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Roytrakul, S. 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT-Food Science and Technology*. 43:86-97.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol*. 11:347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. and Korhonen, H. 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J*. 8:325-331.
- Raghavan, S., y Kristinsson, H. G. 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *J. Food Chem*. 117:582-588.
- Ramirez-Suarez, J. C., Pacheco-Aguilar, R., Ponce-Alquicira, E., Lugo-Sánchez, M. E. Villalobos-Rodríguez, A., y Ortiz-Delgado, I. G. 2010. Bioactivities Found in Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Byproduct Hydrolysates. In: P.J. Bechtel and S. Smiley (eds.). *A Sustainable Future: Fish Processing Byproducts*. Alaska Sea Grant, University of Alaska Fairbanks. 295-309.
- Rao, S., Su, Y., Li, J., Xu, Z., y Yang Y. 2009. Design and expression of recombinant antihypertensive peptide multimer gene in *Escherichia coli* BL21. *J Microbiol Biotechnol*. 19(12):1620-1627.
- Rao, S. q., Liu, S. Ju, T., Xu, W. q., Mei, G. m., Xu, Y. s., y Yang, Y. j. 2012. Design of substrate-type ACE inhibitory pentapeptides with and antepenultimate C-terminal

- proline for efficient release of inhibitory activity. *Biochemical Engineering Journal*. 60:50-55.
- Rebeca, B. D., Pena-vera, M. T., y Diaz-Castaneda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacteria proteases; yield and nutritional value. *Journal of Food Science*. 56:309-314.
- SAGARPA. 2004. Anuario Estadístico de Pesca. Subsecretaría de Pesca, México.
- Saiga, A., Tanabe, S., y Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:3661–3667.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., y Juneja, L. R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*. 86:99–103.
- Sarmadi, B. H., e Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins : A review. *Peptides*. 31:1949-1956.
- Sato, M., Hoskawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., y Nakano, T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 50(21):6245–6252.
- Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification, Principles and Practice*. Springer (Ed.).
- Sewald, N. y Jakube, H. D. 2002. *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VHC. Verlag GmbH & Co. pp. 14-29.
- Shahidi, F. 1994. Seafood processing by-products. In *Seafoods chemistry*. Shahidi, F. and Botta, J. R. London, Blackie Academic & Professional.
- Shamloo, M., Bakar, J., Mat-Hashim, D., y Khatib, A. 2012. Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*. 19(1):183-188.
- Sheih, I. C., Wu, T. K., y Fang, t. J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*. 100:3419-3425.

- Sheih, I., Fang, T. J., Wu, T. K., y Lin, P. H. 2010. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:1202–1207.
- Silva, S. V., y Malcata, F. X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 15:1–15.
- Thorkelsson, G., y Kristinsson, H. G. 2009. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund. Reykjavík: Skýrsla Matis. 14-09.
- Van Elswijk, D. A., Diefenbach, O., Van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U. R., y Van der Greef, J. 2003. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1020:45-58.
- Vermeirssen, V., Camp, J. V., y Verstraete, W. 2002. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys*. 51:75-87.
- Villegas, O. R. 1996. Estudio Comparativo de la Calidad de la Sardina Enlatada en Salsa de Tomate. Tesis de Maestría. CIAD, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megía, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M. y Millán, F. 2006. Bioactive Peptides in Storage Plant Proteins. *Braz. J. Food Technol*. 99-102.
- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y., y Lin, B. 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. 111(2):302-308.
- Whithaker, J. R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker (Ed.). Nueva, York.
- Wijesekara, I. y Kim, S. K. 2010. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry. *Marine Drugs*. 8:080-1093.
- Wijesekara, I., Qian, Z. J., Ryu, B., Ngo, D. H., y Kim, S. K. 2011. Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate. *Food Research International*. 44:703-707.

- Wilson, J., Hayes, M., y Carney, B. 2011. Review: Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chemistry*. 129:235-244.
- Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J., y Burns, B. G. 1986. Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. No. 1448. Halifax, N.S.
- Wu, H. C., Chen, H. M., y Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 36:949–957.
- Yamamoto, N., Maeno, M., y Takano, T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci*. 82:1388-1393.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frigola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*. 114:310–6.