



**INSTITUTO DE LA GRASA**  
Departamento de Alimentación y Salud



**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**  
Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS  
DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ  
(*Lupinus angustifolius* L.)**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> del Carmen Millán Linares, Lda. en Farmacia,  
para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide

M<sup>a</sup> del Carmen Millán Linares  
Sevilla, 2014.



Autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de las propiedades antiinflamatorias de hidrolizados proteicos de altramuz (*Lupinus angustifolius* L.)”**, realizada por D<sup>ª</sup>. M<sup>ª</sup> del Carmen Millán Linares en el Departamento de Alimentación y Salud del Instituto de la Grasa (CSIC) bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente

V.º B.º  
Los Directores

**Dr. Justo Javier Pedroche Jiménez**

**Dra. M<sup>ª</sup> del Mar Yust Escobar**

Conforme la tutora

**Dra. M<sup>ª</sup> Soledad Fernández Pachón**



## **AGRADECIMIENTOS**

Antes de nada, me gustaría dedicar unas palabras que expresen de alguna manera, mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Francisco Millán Rodríguez la oportunidad de incorporarme a su Grupo de Investigación Proteínas Vegetales, por sus inestimables consejos, por confiar desde un principio en mi y darme la oportunidad de realizar este sueño.

A mis Directores de tesis, los Dres. Justo Javier Pedroche Jiménez y M<sup>a</sup> del Mar Yust Escobar. Gracias por brindarme no solo la oportunidad de realizar esta tesis, sino por guiarme durante estos años, por ser un referente para mi, por vuestro apoyo y dedicación, por enseñarme todo lo que sé hoy día, pero sobre todo, por vuestra amistad. Nunca lo olvidaré. Mil gracias.

A Álvaro Villanueva, nuestro Álvaro, por ayudarme desde el primer día que llegué al Instituto, siempre dispuesto a echar una mano, y siempre con una sonrisa. Gracias por ayudarnos tanto a todos.

Al Grupo de Nutrición Celular y Molecular. A los Drs. Francisco José García Muriana y Rocio Abia González, por su incalculable ayuda, por poner a mi disposición todos los instrumentos necesarios para la realización de esta tesis, sin vuestra colaboración mi trabajo no hubiera sido posible. A Sergio López por estar siempre dispuesto a echar una mano, mucha suerte en esta nueva etapa. A ti Bea, que me has ayudado tanto, por enseñarme a disfrutar del trabajo con los cultivos celulares y por todos los momentos que hemos compartido. Te mereces lo mejor. Y a Sergio Montserrat, una de esas personas especiales que te encuentras en el camino y que hacen que mires la vida con una sonrisa. Llegarás muy lejos.

Al Grupo de Genómica, Biología Molecular y Bioquímica. Al Dr. Jose Manuel Martínez Rivas por brindarme su apoyo desde el principio. A Luisa, por todos los momentos,

confidencias, y risas que hemos compartido. A M<sup>a</sup> Dolores Sicardo, nuestra Lola, por dejarme descubrir la persona tan excepcional que eres. Y en especial a David, mi compañero, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, sin ti nada hubiera sido lo mismo.

A todos los miembros del Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas. Al Dr. Enrique Martínez Force, por ayudarme siempre, por responder a mis preguntas que no han sido pocas, y animarme siempre con una galletita de las que no engordan a última hora de la tarde. Gracias Kike. A Manuel, por tantos momentos que hemos pasado juntos, por superarse a sí mismo. Estoy segura que encontrarás tu camino. Al Dr. Joaquín Salas, a Adrián, Ana, Miguel Ángel, Bárbara, Marisol, Arantxa, y Miriam. Y en especial a Mónica, una luchadora, por brindarme su amistad y sus consejos, gracias.

Al Grupo de Neuroinmunoendocrinología Molecular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), y en especial al Dr. Antonio Carrillo Vico, por su continua disposición y su ayuda para realizar mi tesis.

A la Dra. M<sup>a</sup> Soledad Fernández Pachón, mi tutora, por ayudarme en todo lo que he necesitado desde el primer momento. Gracias.

A todos aquellos que han formado parte de mi vida durante estos años, y que de una manera o de otra me habéis ayudado, aunque algunos estéis ahora lejos, siempre os llevaré en mi corazón. A mi Cristi, Ali, Almu, Lourdes, Angy, Antonio, Elena, Isa, Javi, Puri, y Ana. Gracias.

A mis padres, por ser los mejores padres que nadie pueda soñar, por vuestro amor incondicional, por hacerme sentir que con vosotros a mi lado nunca va a pasarme nada malo. No os hubiera inventado mejor. Gracias.

A mi hermanita, por estar siempre ahí, por quererme y cuidar de mi siempre, eres mi mejor ejemplo. Y a mi hermano pequeño, mi debilidad. Estoy orgullosa de vosotros.

A mis suegros, mis otros papás, por vuestro apoyo, por haberme querido y cuidado desde el principio, y por ayudarnos siempre. Gracias.

A mi familia, mis amigos y amigas, y en especial a Viky, Lorena, y Pastori, por ayudarme en cada momento difícil y disfrutar conmigo de cada alegría como si fuera vuestra. Gracias.

Y por último, quiero dedicar unas palabras a Luismi, mi marido, el amor de mi vida. Gracias por creer en mí, por ser mi más fiel admirador, por hacerme querer ser siempre mejor persona, y por llenar mi vida de felicidad.





“Que tu alimento sea tu medicina,  
y que tu medicina sea tu alimento”.

*Hipócrates.*

A mi marido,



|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1  |
| 1.1. El altramuz como materia prima para la elaboración de aislados proteicos. .... | 3  |
| 1.1.1. Definición, origen e historia de <i>Lupinus angustifolius</i> L. ....        | 3  |
| 1.1.2. Cultivo y producción.....  | 5  |
| 1.1.3. Caracterización de la semilla del altramuz.....                              | 8  |
| 1.1.4. El altramuz en la dieta.....   | 13 |
| 1.2. Aislados proteicos de origen vegetal.....                                      | 15 |
| 1.2.1. Preparación de aislados proteicos.....                                       | 16 |
| 1.2.2. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos. ....                          | 20 |
| 1.3. Hidrolizados proteicos vegetales.....  | 23 |
| 1.4. Tipos y aplicaciones de los hidrolizados proteicos en la alimentación.....     | 27 |
| 1.5. Alimentos funcionales. ....  | 32 |
| 1.5.1. Definición y tipos de alimentos funcionales.....                             | 32 |
| 1.5.2. Declaraciones de propiedades saludables. ....                                | 33 |
| 1.5.3. Péptidos bioactivos.....   | 35 |
| 1.6. La respuesta inflamatoria. ....  | 41 |
| 1.6.1. Definición y factores de riesgo. ....  | 41 |
| 1.6.2. Enzimas implicadas en la ruta inflamatoria.....                              | 43 |
| 1.6.3. Monocitos y macrófagos. ....   | 44 |
| 1.6.4. Influencia de la dieta en la respuesta inflamatoria crónica. ....            | 47 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 49 |
| 3. APARATOS, MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 55 |
| 3.1. Aparatos.....  | 57 |
| 3.1.1. Microanalizador elemental.....   | 57 |
| 3.1.2. Reactor de hidrólisis. ....  | 57 |
| 3.1.3. Equipo de ultrafiltración.....   | 57 |
| 3.1.4. Equipos de cromatografía líquida.....  | 57 |
| 3.1.5. Centrífugas.....   | 58 |
| 3.1.6. Incubadores.....   | 58 |
| 3.1.7. Espectrofotómetros.....  | 58 |
| 3.1.8. Lectores de microplacas. ....  | 59 |
| 3.1.9. Cabina de seguridad biológica.....   | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.10. Equipo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....             | 59 |
| 3.1.11. Equipo de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR). ....               | 59 |
| 3.1.12. Citómetro de flujo. ....   | 59 |
| 3.1.13. Otros aparatos.....  | 60 |
| 3.2. Materiales.....   | 61 |
| 3.2.1. Material vegetal.....   | 61 |
| 3.2.2. Columnas de cromatografía líquida. ....                               | 61 |
| 3.2.3. Patrones de proteínas para cromatografía de filtración en gel. ....   | 61 |
| 3.2.4. Patrones de aminoácidos. ....   | 61 |
| 3.2.5. Enzimas usadas en la determinación del contenido de fibra total. .... | 62 |
| 3.2.6. Enzimas proteolíticas.....  | 62 |
| 3.2.7. Otros productos.....  | 63 |
| 3.3. Métodos.....  | 65 |
| 3.3.1. Determinación cuantitativa de proteínas y péptidos.....               | 65 |
| 3.3.2. Determinación de cenizas y humedad. ....                              | 65 |
| 3.3.3. Determinación de fibra total. ....                                    | 65 |
| 3.3.4. Determinación de polifenoles y azúcares.....                          | 66 |
| 3.3.5. Determinación cuantitativa de aminoácidos. ....                       | 68 |
| 3.3.6. Obtención de aislados proteicos de altramuz. ....                     | 70 |
| 3.3.7. Hidrólisis del aislado proteico de altramuz. ....                     | 70 |
| 3.3.8. Determinación del grado de hidrólisis. ....                           | 71 |
| 3.3.9. Ensayos de actividad enzimática de Izyme AL.....                      | 72 |
| 3.3.10. Ensayo de actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> . ....                | 72 |
| 3.3.11. Ensayo de actividad ciclooxigenasa-2.....                            | 73 |
| 3.3.12. Ensayo de actividad trombina. ....                                   | 73 |
| 3.3.13. Ensayo de actividad transglutaminasa. ....                           | 74 |
| 3.3.14. Cultivo celular y tratamientos. ....                                 | 74 |
| 3.3.15. Medida de la proliferación celular. ....                             | 75 |
| 3.3.16. Análisis del contenido de ADN celular.....                           | 75 |
| 3.3.17. Viabilidad celular. ....   | 76 |
| 3.3.18. Medida de la apoptosis. ....   | 76 |
| 3.3.19. Extracción de ARN y análisis mediante PCR. ....                      | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.20. Ensayo de migración.....  | 78  |
| 3.3.21. Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA). .....  | 78  |
| 3.3.22. Medida del nitrito en macrófagos derivados de THP-1.....  | 79  |
| 3.3.23. Purificación de péptidos con actividad antiinflamatoria.....  | 79  |
| 3.3.23.1. Ultrafiltración. ....   | 79  |
| 3.3.23.2. Cromatografía de fase reversa. ....   | 79  |
| 3.3.23.3. Cromatografía de filtración en gel. ....  | 80  |
| 3.3.24. Análisis estadístico.....   | 81  |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 83  |
| 4.1. Obtención de aislados proteicos de altramuz. ....  | 85  |
| 4.2. Obtención de hidrolizados proteicos de altramuz.....   | 88  |
| 4.2.1. Caracterización de la enzima experimental Izyme AL. ....   | 89  |
| 4.2.2. Obtención de los hidrolizados proteicos de altramuz.....   | 90  |
| 4.3. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos de altramuz.....                                    | 92  |
| 4.3.1. Efecto de los hidrolizados proteicos de altramuz sobre diversas enzimas implicadas en la ruta inflamatoria. ....         | 92  |
| 4.3.1.1. Inhibición de la actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> . ....   | 93  |
| 4.3.1.2. Inhibición de la actividad ciclooxigenasa-2. ....  | 94  |
| 4.3.1.3. Inhibición de la actividad trombina. ....  | 96  |
| 4.3.1.4. Inhibición de la actividad transglutaminasa.....   | 97  |
| 4.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos de las diferentes enzimas inflamatorias de los hidrolizados seleccionados..... | 99  |
| 4.3.3. Efecto antiinflamatorio de los HPA en macrófagos derivados de células THP-1. ....  | 100 |
| 4.3.3.1. Efecto de los HPA sobre la integridad celular de los macrófagos derivados de THP-1. ....                               | 100 |
| 4.3.3.2. Efecto de los HPA sobre la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias. ....                                       | 106 |
| 4.3.3.3. Efecto de los HPA sobre la producción de citoquinas. ....  | 109 |
| 4.3.3.4. Efecto de los HPA sobre la producción de óxido nítrico. ....   | 112 |
| 4.3.3.5. Efecto de los HPA sobre la capacidad quimiotáctica de los macrófagos derivados de THP-1 humanos.....                   | 113 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.4. Caracterización de los HPA seleccionados. ....                     | 115 |
| 4.4. Purificación de péptidos con actividad antiinflamatoria. ....        | 118 |
| 4.4.1. Purificación de los péptidos por ultrafiltración. ....             | 118 |
| 4.4.2. Purificación de PM2 por cromatografía de fase reversa. ....        | 121 |
| 4.4.3. Purificación de F3 por cromatografía filtración en gel. ....       | 124 |
| 4.5. Estudio de la actividad antiinflamatoria del péptido sintético. .... | 128 |
| 5. CONCLUSIONES. ....   | 135 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA. ....   | 139 |
| PUBLICACIONES. ....   | 169 |

## **1. INTRODUCCIÓN.**





## **1.1. El altramuz como materia prima para la elaboración de aislados proteicos.**

### **1.1.1. Definición, origen e historia de *Lupinus angustifolius* L.**

El altramuz es una leguminosa nativa de la región mediterránea, norte de África y Suramérica. Se han descrito más de 300 especies aunque las más importantes son el altramuz blanco (*Lupinus albus* L.), altramuz azul o de hojas estrechas (*Lupinus angustifolius*), altramuz amarillo (*Lupinus luteus* L.), altramuz andino de Suramérica (*Lupinus mutabilis* L.), y el altramuz del oeste australiano (*Lupinus consentinii* L.) (Bhardwaj, 2010). Las tres primeras especies se denominan altramuz dulce debido a su bajo contenido en alcaloides, compuestos de sabor amargo y potencialmente tóxicos (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a).

*L. angustifolius* pertenece a la familia de las Fabaceae, tribus Genisteeae. Es una planta herbácea, anual y pubescente de hasta 100 cm de altura. Presenta hojas palmaticompuestas, alternas, con peciolos de 2 a 7 cm de largo. Sus láminas, digitadas, se encuentran divididas en 5 a 9 folíolos de forma lineal. El nombre de esta especie, “angustifolio”, que significa de “hoja estrecha”, se asignó para diferenciarlo de otras especies cercanas de hoja más ancha. Florece en primavera y principios de verano formando racimos de flores vistosas de color azul, de ahí su también conocido nombre de “altramuz azul”. Su fruto es una legumbre que contiene de 3-5 semillas con forma de esfera achatada.

La taxonomía de *Lupinus* sp. ha sido y es problemática y, aunque se han realizado trabajos de identificación con métodos sofisticados, aún persisten los problemas para la identificación y a pesar de ello, se siguen descubriendo nuevas especies en Europa. La Figura 1 muestra la imagen y la Figura 2 la taxonomía de *L. angustifolius*.



**Figura 1.** Imagen de la flor, las hojas y el fruto de *L. angustifolius*.

**TAXONOMÍA de *Lupinus angustifolius* L.**

Reino - **Plantae**

División - **Tracheophyta**

Subdivisión- **Spermatophytina**

Clase - **Magnoliopsida**

Superorden - **Rosanae**

Orden - **Fabales**

Familia - **Fabaceae**

Tribus - **Genistae**

Género - **Lupinus L.**

Especie- **Lupinus angustifolius L.**

Subespecie - **Lupinus angustifolius L. subsp. Angustifolius**

- **Lupinus angustifolius subsp. Reticulatus (Desv). Arcang.**

**Figura 2.** Imagen de la taxonomía de *L. angustifolius*. ILDIS World Database of Legumes 2010. (Copyright © ILDIS).

La historia del altramuz como alimento se remonta hace más de 2000 años. Formó parte en alimentación de las civilizaciones egipcias y pre-incas y su cultivo fue promovido por los romanos como fertilizante para la recuperación de suelos pobres debido a la presencia de *rhizobium* en sus raíces. Estas bacterias forman nódulos en las raíces y fijan el nitrógeno atmosférico. Parte de este nitrógeno es empleado por la planta para su crecimiento y la otra parte puede ser usada como “abono verde” para futuros cultivos a través de cultivos rotatorios. Al retirar los restos vegetales al final de la etapa de crecimiento, lo mejor es retirar las partes aéreas y dejar las raíces en la tierra para liberar su nitrógeno, siendo capaces de acumular 200 kg de nitrógeno por hectárea. El nombre del lupino azul proviene de la palabra latina “Lupus”, que significa lobo, con el que el antiguo botánico Plinio comparó a la planta que se propaga ávidamente.

Federico II el grande, rey de Prusia, introdujo el cultivo de altramuz en el norte de Europa, al ordenar en 1783 su plantación en numerosas tierras para mejorar los suelos pobres de Alemania. En la década de 1860, el altramuz se había extendido a las regiones bálticas para mejorar los suelos ácidos y tipo arenoso de estas zonas. En los años 20 del siglo pasado, se desarrollaron en Alemania las variedades dulces de altramuz. *L. angustifolius* no se convirtió en una leguminosa importante en cuanto a su cultivo hasta 1950-1970, cuando en Australia occidental Gladstones obtuvo variedades, en las que estabilizó la dehiscencia de la vaina y aceleró el inicio reproductivo, modificando la respuesta a la vernalización (Berger *et al.*, 2012).

Principalmente, el altramuz se utiliza como forraje en alimentación animal para aves de corral y pienso para el ganado, aunque algunas variedades, se destinan para consumo humano y se pueden encontrar en gran cantidad de platos saludables (grano salmuerado, galletas, pasteles, salchichas veganas, fideos, etc).

### **1.1.2. Cultivo y producción.**

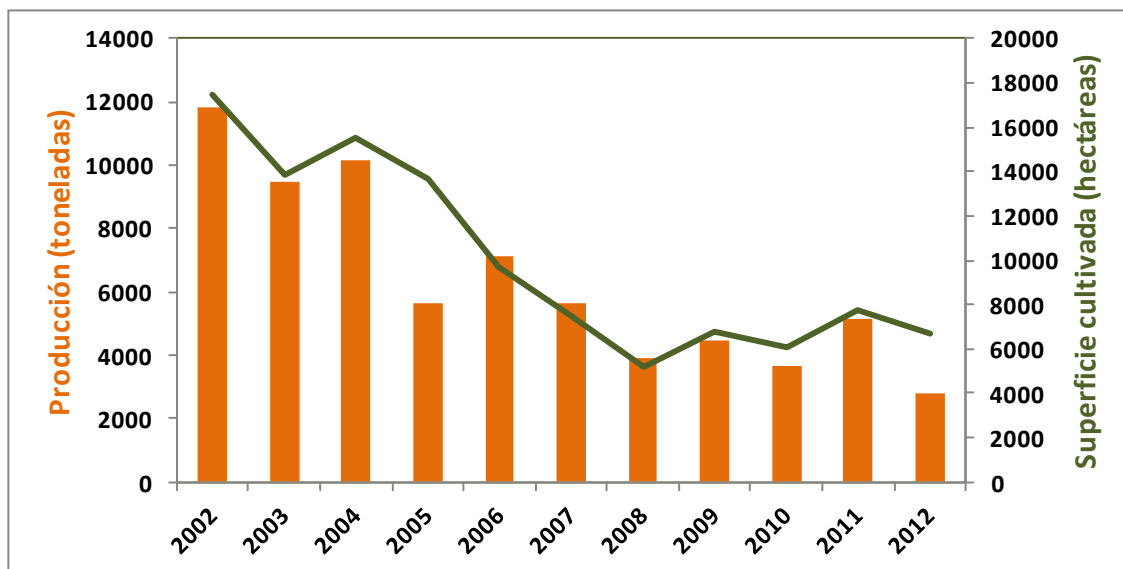
En líneas generales, las especies del género *Lupinus* no muestran una gran resistencia al frío, aunque prefieren climas frescos. Las distintas especies se desarrollan

bien con temperaturas diurnas comprendidas entre 20-25°C, interfiriendo negativamente en su crecimiento temperaturas superiores a 28°C. Requieren suelos con pH inferiores a 6.8, no pudiéndose cultivar en aquellos suelos que tengan contenidos medios-altos de cal, aunque dependiendo de la especie muestran unos requerimientos más específicos (Nadal *et al.*, 2004). Hasta 1980, el principal productor de altramuz fue la Unión Soviética seguida de los países del antiguo Bloque del Este, fundamentalmente Polonia y Alemania del Este. Durante este período, se cultivaba fundamentalmente *L. luteus* y *L. albus*, pero tras la aparición de la antracnosis en la década de 1990, se fomentó la producción de *L. angustifolius*, variedad más resistente. La producción mundial de altramuz se incrementó de 250000 toneladas en 1980 a 2000000 en 1999, la gran mayoría de este incremento proveniente de Australia. La Tabla 1 muestra los valores correspondientes a la superficie cultivada (ha) y producción de altramuz (t) en diferentes países. Australia es el mayor productor de altramuz del mundo, abarcando más del 75% de la producción mundial. Otros países importantes en producción de altramuz son los anteriormente denominados países del Este. Además de Australia y Europa, el altramuz se cultiva en Suramérica, siendo Chile el cuarto productor mundial, con casi 39000 toneladas en 2013. España ocupa el duodécimo lugar en producción y superficie cultivada de altramuz, siendo las especies más cultivadas el altramuz blanco (*L. albus*), el altramuz amarillo (*L. luteus*) y altramuz azul o de hojas estrechas (*L. angustifolius*).

En España, la superficie cultivada y la producción de altramuz han ido en descenso en la última década (Figura 3). Según las primeras estimaciones de la Secretaría General Técnica del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la superficie de proteaginosas en 2013 seguirá con la tendencia descendente iniciada la campaña anterior. De hecho, el mayor descenso en el cultivo de proteaginosas se prevé en los altramuces, con más del 20%, seguido de los guisantes secos, con casi un 2%. En la campaña anterior la reducción de la superficie fue de un 10% y un 30%, respectivamente. En el cultivo del altramuz, la mitad de la producción se localiza en Castilla y León.

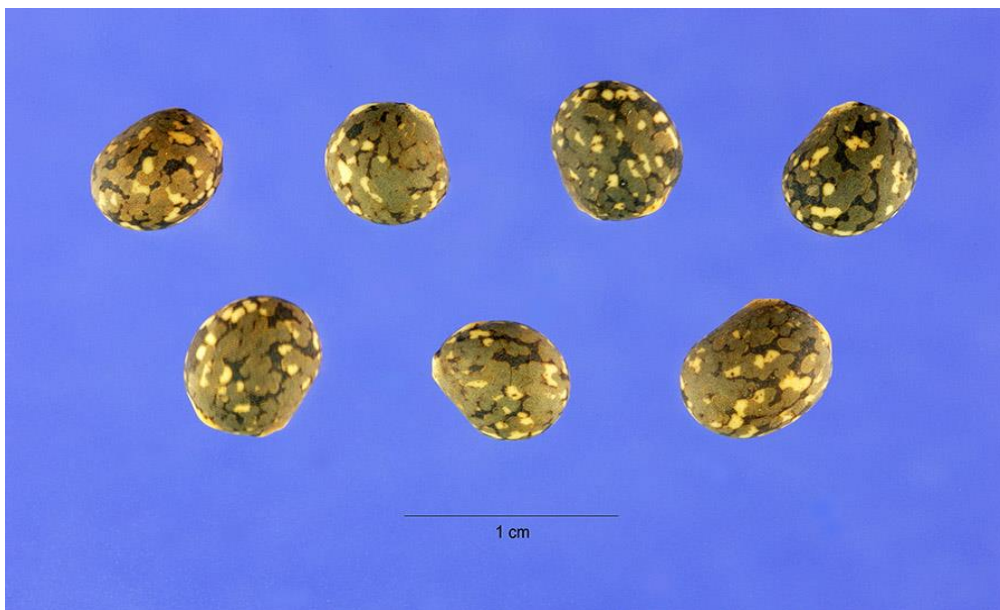
**Tabla 1.** Superficie cultivada y producción de altramuz (FAOSTAT, 2012).

|                      | Superficie cultivada<br>(ha) | Producción<br>(t) |
|----------------------|------------------------------|-------------------|
| <b>Australia</b>     | 689064                       | 981512            |
| <b>Polonia</b>       | 49221                        | 77799             |
| <b>Bielorrusia</b>   | 20735                        | 42495             |
| <b>Chile</b>         | 21467                        | 38949             |
| <b>Ucrania</b>       | 24000                        | 37500             |
| <b>Alemania</b>      | 21500                        | 27600             |
| <b>Rusia</b>         | 17800                        | 26361             |
| <b>Sudáfrica</b>     | 13600                        | 18000             |
| <b>Perú</b>          | 9656                         | 11740             |
| <b>Francia</b>       | 2553                         | 6197              |
| <b>Italia</b>        | 5000                         | 6000              |
| <b>España</b>        | 7700                         | 5200              |
| <b>Lituania</b>      | 5100                         | 5100              |
| <b>Egipto</b>        | 1600                         | 3500              |
| <b>Ecuador</b>       | 4705                         | 1619              |
| <b>Total mundial</b> | 887014                       | 1290116           |

**Figura 3.** Evolución de la producción (toneladas) y superficie cultivada (hectáreas) de altramuz en España desde el año 2002 hasta 2012. FAOSTAT, 2014.

### 1.1.3. Caracterización de la semilla del altramuz.

La semilla de altramuz es una excelente fuente de nutrientes, no sólo de proteínas, sino también de fibra, lípidos, minerales y vitaminas (Kohajdová *et al.*, 2011). Se producen de 3-5 por vaina, con forma de elipsoide a subglobosa y sin brillo, de 8-10 mm de largo, y de color amarillo-marrón, marrón oscuro o gris con manchas amarillas (Figura 4).



**Figura 4.** Imagen obtenida de USDA, NRCS. 2013. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 21 October 2013). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA.

#### ***Proteínas.***

La presencia de un alto porcentaje de proteínas en las semillas de altramuz es el aspecto más importante de este género. Existen variaciones en el contenido de proteínas entre las distintas especies y cultivos como resultado de las condiciones de crecimiento y el tipo de suelo (Martínez-Villaluenga, *et al.*, 2006a).

Thomas Burr Osborne clasificó las proteínas vegetales en función de su solubilidad en cuatro grupos: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas), o glutelinas (solubles en ácidos o álcalis diluidos) (Osborne, 1924).

Las globulinas son el principal componente de las proteínas no sólo de la semilla de altramuz, sino de las leguminosas en general. Sin embargo, la concentración de las globulinas puede variar ampliamente dependiendo del cultivo y, el rango puede oscilar entre 40-80% del total de proteínas de soja y 65-80% del total de proteínas de guisante. Las proteínas de las semillas de *Lupinus* sp. están constituidas por albúminas (25%) y globulinas (75%) (Fontanari *et al.*, 2012) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Distribución aproximada de las diferentes clases de proteínas en varias fuentes vegetales de acuerdo con la clasificación de Osborne (Day, 2013). Los datos están expresados en porcentaje.

| Proteínas | Albúminas | Globulinas | Prolaminas | Glutelinas |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Soja      | -         | 90         | -          | -          |
| Guisante  | 15-25     | 50-60      | -          | -          |
| Garbanzo  | 8-12      | 53-60      | 3-7        | 19-25      |
| Altramuz  | 25        | 75         | -          | -          |
| Canola    | 20        | 60         | 2-5        | 10-20      |

Las globulinas tienen un alto contenido en aspártico/asparagina, glutámico/glutamina y arginina, siendo limitante en su contenido en aminoácidos azufrados. De las tres globulinas identificadas en el altramuz,  $\gamma$ -conglutina,  $\beta$ -conglutina y  $\alpha$ -conglutina, esta última representa el 76.6% del total (Lqari *et al.*, 2004). La  $\alpha$ -conglutina pertenece a la familia de las globulinas 11S o leguminas. Es una proteína hexamérica de 50 a 60 kDa, constituida por la unión mediante puentes disulfuro de tres subunidades ácidas, con peso molecular de 40 kDa, y tres subunidades básicas de 20 kDa (Sanz *et al.*, 2010; Sirtori *et al.*, 2010). La  $\beta$ -conglutina pertenece a la familia de globulinas 7S, también llamada vicilinas. Es una proteína trimérica deficiente en aminoácidos azufrados con pesos moleculares de 150-190 kDa,

no observándose puentes disulfuros (Sanz *et al.*, 2010). La  $\gamma$ -conglutina es una proteína específica del altramuz rica en aminoácidos azufrados, característica inusual en las leguminosas (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a). Está compuesta por dos subunidades (17 y 30 kDa) unidas mediante puentes disulfuro. Su estructura depende fuertemente del pH del medio, por lo que puede formar tetrámeros o hexámeros a pH 7 y existe como monómero a pH ácido (Capraro *et al.*, 2010). Las proteínas 2S constituyen el componente principal de la fracción de albúminas. Las albúminas 2S se caracterizan por sedimentar a una velocidad de ultracentrifugación de 1.7-2S y poseer un punto isoeléctrico (pI) elevado (pI > 10). Son un grupo heterogéneo que presenta de 10-20 fracciones con diferentes pesos moleculares, forman complejos con carbohidratos y ácidos nucleicos, son relativamente ricas en treonina, triptófano y aminoácidos azufrados, y además son más ricas que las globulinas en aminoácidos esenciales especialmente en metionina (Lampart-Szczapa, 2001). Es importante destacar que, las albúminas contribuyen en más del 50% del azufre total en las semillas de leguminosas, como los guisantes y altramuces, a pesar de que representan sólo 10-30% de las proteínas totales (Day, 2013).

### ***Fibra dietética.***

La fibra dietética representa hasta el 40% de la semilla de altramuz, valor más elevado que en la mayoría de las leguminosas. En el altramuz, el principal componente de la fibra dietética es celulosa (79%), y en menor proporción aparecen la hemicelulosa y la lignina (14 y 7% respectivamente) (Kohajdová, 2011). Hay estudios que avalan el potencial de la fibra de altramuz como ingrediente funcional, se ha demostrado que presenta propiedades hipocolesterolémicas, disminuye el tiempo de tránsito intestinal y diversos marcadores de la función intestinal, disminuyendo el riesgo de cáncer de colon, aunque se requieren más estudios sobre los efectos beneficiosos de su administración, en la alimentación humana y animal (Johnson *et al.*, 2006; Fechner *et al.*, 2011).



**Lípidos.**

El contenido en lípidos de las distintas especies de altramuz oscila entre el 1% en algunos cultivos de *L. luteus* y el 21 % en el caso de *L. mutabilis*. Las semillas de *L. angustifolius* contienen menos del 6 % de aceite (Petterson, 2000). Los lípidos de las semillas de *L. angustifolius* están constituidos por triglicéridos (71.1%), fosfolípidos (14.9%), esteroides libres (5.2%), glicolípidos (3.5%), ésteres de esteroides y ceras (0.5%), ácidos grasos libres (0.4%), hidrocarburos y material ceroso no identificado, contribuyendo cada uno, el 0.4% aproximadamente (Van Barneveld, 1999).

En general, la calidad de la grasa depende del perfil y el contenido de ácidos grasos. En el *L. angustifolius* el ácido graso mayoritario es linoleico (48.3%), seguido de oleico (31.2%), palmítico (7.6%), y linolénico (5.4%) (Van Barneveld, 1999). El contenido en ácido erúxico, considerado como un factor antinutricional, es del 0.56% para *L. angustifolius* (Chiofalo *et al.*, 2012).

**Vitaminas y Minerales.**

En cuanto al contenido en vitaminas, la harina de la semilla de *L. angustifolius* contiene  $\beta$ -caroteno (pro vitamina A) que le otorga un color amarillo. También se han identificado otras como tiamina, riboflavina, biotina, folato, colina, niacina, ácido pantoténico y  $\alpha$ -tocoferol (Petterson, 2000). Entre los minerales más frecuentes de la semilla de altramuz se incluyen calcio, magnesio, hierro, fósforo, potasio, azufre y sodio. Sin embargo, el contenido es variable dependiendo del tipo de suelo, y en situaciones en las que se utilizan los altramuces como forraje, durante un largo período, la suplementación con sal puede ser aconsejable.

**Componentes no nutricionales de la semilla de altramuz.**

El altramuz silvestre se caracteriza por contener cantidades importantes de alcaloides del grupo quinolizidina, que le confiere toxicidad y un sabor amargo a la semilla, limitando su uso en alimentación. En el *L. angustifolius*, lupanina (42-59%), 13-hidroxilupanina (24-45%), angustifolina (7-15%) y  $\alpha$ -isolupanina son los mayoritarios.

No obstante, las variedades de *L. angustifolius* actualmente en cultivo tienen un bajo contenido en alcaloides, no superando los 280 mg/kg (Jezierny *et al.*, 2010).

El ácido fítico es un componente muy frecuente en los granos de cereales y las semillas de leguminosas (1-2%), cuya principal función es almacenar fósforo, como fuente de energía para la planta (Frontela *et al.*, 2008). Su efecto antinutricional se debe, a su capacidad para formar complejos insolubles con iones calcio y/o zinc, lo que dificulta la absorción y utilización de estos minerales. En la semilla de altramuz, el contenido de ácido fítico es alrededor de 0.8 g por 100 g (Trugo *et al.*, 2003), similar al de la soja o el guisante. A pesar de su efecto negativo sobre la biodisponibilidad de los minerales, se ha descrito que el ácido fítico es un agente antioxidante, anticarcinógeno, hipoglicémico e hipolipidémico (Vadivel & Biesalski, 2012; Shafie *et al.*, 2013).

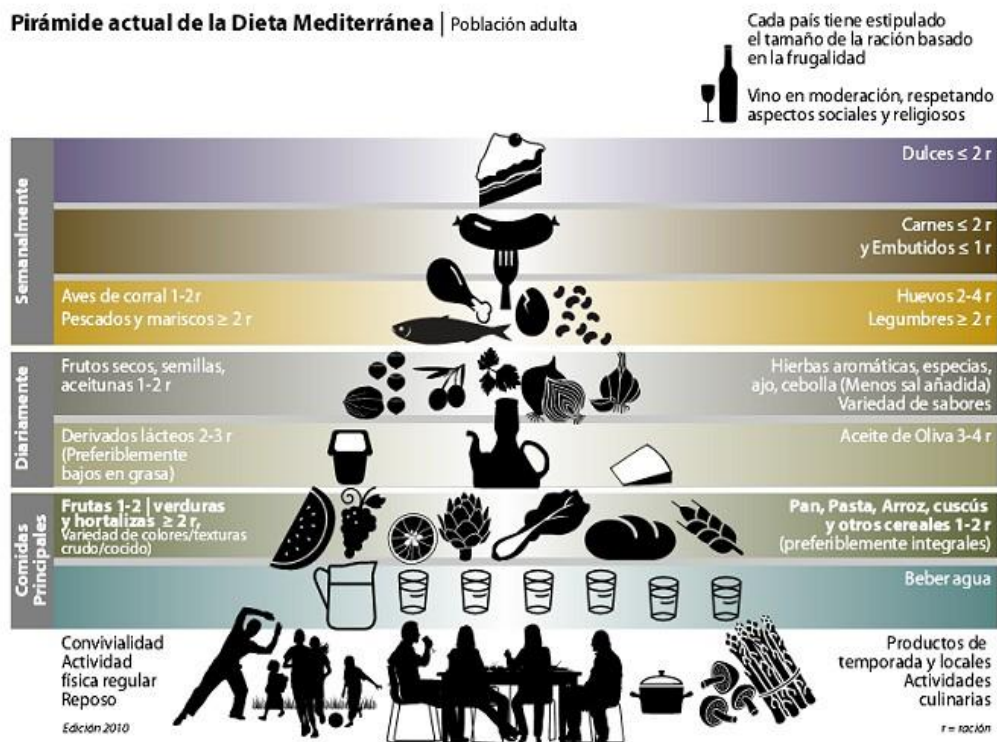
Las saponinas son glicósidos triterpénicos o esteroideos, que aparecen en una gran variedad de plantas y especialmente en las semillas de leguminosas. Se caracterizan por poseer un sabor astringente y su efecto antinutricional se debe, a que producen un incremento de la permeabilidad en células de la mucosa intestinal, lo que conduce a una inhibición del transporte activo a través de la pared intestinal (Jezierny *et al.*, 2010). Algunas saponinas de plantas producen efectos adversos sobre el crecimiento de los animales, sobre todo rumiantes. Sólo trazas de saponinas están presentes en *L. albus* y, aunque en *L. angustifolius* su contenido oscila entre 480-730 mg/kg (Jezierny *et al.*, 2010), no hay evidencias de que tengan ningún efecto sobre la absorción intestinal.

Otros componentes no nutricionales presentes en las leguminosas que pueden causar alteraciones digestivas al ser consumidos, tanto por el hombre como por los animales, son los inhibidores de las proteasas digestivas tripsina y quimotripsina, taninos y lectinas. En el altramuz, la cantidad de estas sustancias químicas es mucho más baja que en el resto de leguminosas, siendo prácticamente despreciable (Guillamón *et al.*, 2008).

#### **1.1.4. El altramuz en la dieta.**

Una dieta suficiente y equilibrada, combinada con el ejercicio físico regular, es un elemento fundamental de buena salud y puede prevenir enfermedades como la obesidad, la hipertensión, la diabetes, la anemia y la osteoporosis. Por el contrario, según la OMS (2013), una mala nutrición puede reducir la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental, y reducir la productividad (<http://www.who.int/topics/nutrition/es/>). El primer objetivo de la dieta es el aporte de la energía necesaria, para llevar a cabo los procesos metabólicos y de trabajo físico diario. Este aporte calórico depende de múltiples factores como son la edad, el sexo o el estado fisiológico (embarazo, lactancia, etc.).

Las legumbres son muy importantes desde un punto de vista nutricional, ya que son un alimento vegetal ampliamente disponible que contiene buenas cantidades de proteínas y de hidratos de carbono, de ahí que su ingesta recomendada sea superior a dos veces por semana (Figura 5). El interés en estas semillas ha crecido en los últimos años, debido a la necesidad de satisfacer la demanda mundial de consumo de proteínas y, el riesgo relacionado con el consumo de alimentación de origen animal, fundamentalmente en países en desarrollo. En relación directa con la salud, comer proteínas animales en exceso, acarrea graves problemas sanitarios (obesidad, trastornos cardiovasculares, hipertensión, problemas renales) por su asociación con una mayor ingesta de calorías, grasas saturadas, colesterol y sodio. A partir de estos datos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya la recomendación de un menor consumo de carne en los países desarrollados como elemento de cambio hacia una alimentación más saludable y equilibrada (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a).



**Figura 5.** Imagen de la pirámide nutricional de la dieta mediterránea.

El altramuz dulce se utiliza fundamentalmente en alimentación animal, con un grado de utilización medio/alto en todas las especies. El alto contenido de lisina y bajo en metionina, complementa el de otras harinas como la de trigo, que es pobre en lisina y relativamente alta en aminoácidos azufrados (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006b; Pisariková *et al.*, 2008). Su contenido en fibra puede resultar limitante en la formulación de piensos animales, aunque su grado de lignificación es bajo.

El altramuz es una de las más antiguas leguminosas cultivadas y por sus características proteínicas, fue uno de los pilares alimenticios de todos los pueblos del mediterráneo. En alimentación humana, el uso más habitual del altramuz es el consumo como aperitivo en salmuera. También suelen cocerse para elaborar sopas, potajes o ensaladas. El altramuz puede utilizarse como sustituto de la soja en diversos platos regionales como el *tempe* (indonesio), el *miso* o el *nato* (japoneses). A partir del

altramuz se preparan diversos derivados como harina, sustitutos de café, aceites e incluso patés.

La harina de altramuz, se ha empleado como sustituto parcial de la harina de trigo para la elaboración de pan, encontrando que reduce la presión arterial (Lee *et al.*, 2009). Otros estudios demuestran que, añadir altramuz a bebidas ricas en carbohidratos, tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa en pacientes diabéticos tipo II (Dove *et al.*, 2011).

La harina de altramuz se considera una excelente materia prima, para la suplementación de diversos productos debido a su alto contenido en proteínas y, se utiliza como sustituto del huevo en productos de pastelería. El altramuz se utiliza en ocasiones como sustituto del trigo en productos sin gluten (Kohajdová *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha sugerido que los altramuces deben ser incluidos en la lista de alérgenos alimentarios, regulada por la Directiva Europea sobre el etiquetado de productos alimenticios, ya que se han identificado alérgenos en diferentes especies de altramuz. Las principales proteínas alergénicas del altramuz son  $\alpha$ - y  $\beta$ -conglutinas (Sanz *et al.*, 2010). En concreto, lupan 1, una  $\beta$ -conglutina de *L. angustifolius*, ha sido identificada como alérgeno principal del altramuz en pacientes que mostraron reacción tras su ingestión (Goggin *et al.*, 2008).

## **1.2. Aislados proteicos de origen vegetal.**

Los aislados proteicos preparados a partir de materiales vegetales son ingredientes alimentarios de alta calidad, con contenidos proteicos que superan el 90%, y se utilizan para mejorar tanto la composición nutricional como las características funcionales de los alimentos. Algunos de estos aislados, obtenidos a partir de harina desengrasada de soja, llevan utilizándose en alimentación desde hace más de 30 años (Waggle *et al.*, 1989).

El interés en el aprovechamiento de estas proteínas, ha propiciado el desarrollo en procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la generación de concentrados y aislados proteicos (Vioque *et al.*, 2001b). La obtención de concentrados proteicos a partir de la harina vegetal tiene como objetivo principal, la eliminación de los compuestos solubles no proteicos. Como resultado se obtiene un producto rico en azúcares insolubles y proteínas.

### **1.2.1. Preparación de aislados proteicos.**

Las principales materias primas utilizadas para la preparación de aislados proteicos vegetales son, las semillas de plantas ricas en proteínas (Tabla 3), principalmente leguminosas como garbanzo (Kaur & Singh, 2007), haba (Vioque *et al.*, 2012) y guisante (Adebiyi & Aluko, 2011), y subproductos de las industrias extractoras de aceite como las harinas desengrasadas de soja (Lai *et al.*, 2013), colza (Aider & Barbana, 2011) y girasol (Ivanova *et al.*, 2013).

El proceso de obtención de aislados proteicos supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos para conseguir un producto final con el 80-90% de proteínas.

**Tabla 3.** Composición media y valor proteico de diversas semillas vegetales (Cheftel *et al.*, 1989).

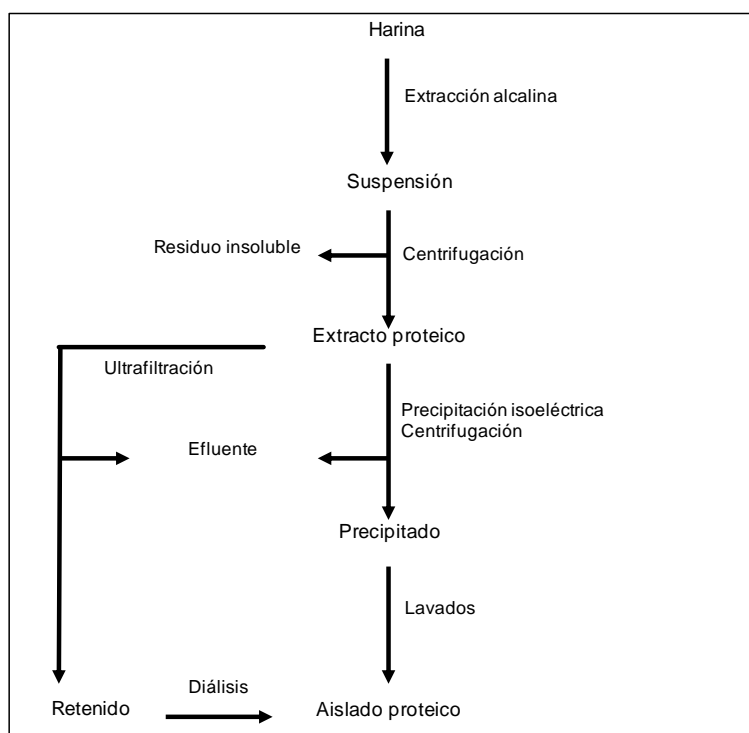
|                 | Proteínas (%) | Lípidos (%) | Glúcidos (%) | CEP | Aminoácido limitante | Factores anti nutricionales o tóxicos                           |
|-----------------|---------------|-------------|--------------|-----|----------------------|---|
| <b>Soja</b>     | 40            | 20          | 15           | 2.3 | Met                  | IT, hemaglutininas, fitatos de saponina, $\alpha$ -galactósidos |
| <b>Girasol</b>  | 30            | 40          | 26           | 2.1 | Lys                  | Polifenoles   |
| <b>Colza</b>    | 26            | 33          | 35           | 2.6 | equilibrado          | Glucosinolatos, sinapina  |
| <b>Guisante</b> | 23            | 2           | 70           | 2.0 | Met                  | IT, fitatos   |
| <b>Trigo</b>    | 14            | 2           | 78           | 1.8 | Lys                  |   |
| <b>Maíz</b>     | 10            | 5           | 80           | 1.2 | Lys, Trp             |   |
| <b>Arroz</b>    | 8             | 1           | 87           | 1.7 | Lys                  |   |
| <b>Altramuz</b> | 40            | 10          | 45           | 0.7 | Met                  | Alcaloides  |
| <b>Haba</b>     | 30            | 2           | 60           | 1.8 | Met                  | Vicina, convicina, taninos, IT                                  |
| <b>Algodón</b>  | 53            | 30          | 10           | 2.3 | Lys, Met             | Gosipol   |
| <b>Garbanzo</b> | 21            | 5           | 58           | 1.7 | Met                  | IT, polifenoles   |
| <b>Patata</b>   | 9             | 0           | 73           | 2.0 | Lys, Thr             |   |

CEP: coeficiente de eficacia proteica, calculado sobre la base de un CEP de 2.5 para la caseína.

IT: inhibidores de tripsina.

El desengrasado de la harina mediante extracción en soxhlet con hexano, constituye el paso inicial del proceso de obtención de aislados proteicos. La purificación de proteínas mediante extracción en medio alcalino, y posterior precipitación a su punto isoeléctrico (pI) o recuperación por ultrafiltración, es la forma más habitual de obtener aislados proteicos (Mondor *et al.*, 2010). Este proceso se realiza en dos etapas (Figura 6). En la primera, las proteínas se solubilizan a pH alcalino para separarlas del resto de los compuestos no solubles, principalmente fibra y glúcidos insolubles. El extracto obtenido contiene, además de las proteínas, el resto de componentes solubles de la harina (compuestos nitrogenados no proteicos, azúcares solubles, polifenoles, sales, etc.). Los factores principales que hay que considerar en esta etapa son el pH, relación solvente/materia prima, la duración y el número de

extracciones. Aunque muchas de las proteínas vegetales son solubles a pH próximos a la neutralidad, se prefiere la extracción a pH alcalino, para favorecer la solubilización de las proteínas que pueden desnaturalizarse durante la extracción del aceite (Zhou *et al.*, 1990). Además, algunas proteínas, como las glutelinas, requieren un pH igual o superior a 11 para poder ser extraídas. Como agente alcalino suele usarse hidróxido sódico. También es posible emplear agentes reductores, como sulfito sódico, para prevenir la oxidación de sustancias fenólicas que pueden oscurecer el aislado (Lqari *et al.*, 2002).



**Figura 6.** Elaboración de aislados proteicos a partir de harinas desengrasadas mediante extracción alcalina y precipitación isoeléctrica o ultrafiltración.

Otro de los factores que hay que tener en cuenta en esta primera etapa de solubilización de las proteínas es, la relación materia prima/solvente. La utilización de relaciones bajas conlleva un aumento de la viscosidad del extracto y dificulta, por tanto, la correcta centrifugación de la suspensión. Sin embargo, relaciones altas dan lugar a volúmenes demasiado elevados, dificultando la operatividad del proceso. De



igual modo, el tiempo de extracción es un factor importante, no suele ser superior a los sesenta minutos, ya que más tiempo disminuye los rendimientos por desnaturalización y coagulación de las proteínas, debido a la formación de espumas (Sefa-Dedeh & Stanley, 1979). Por último, el número de extracciones no suele ser superior a tres, ya que con un número mayor se ha observado que, las diferencias en cuanto a rendimientos de extracción no son significativas (Lqari *et al.*, 2002).

La segunda etapa tiene por objeto la concentración de las proteínas y, sobre todo, su purificación respecto al resto de componentes solubilizados. Los procedimientos que suelen seguirse son:

- a) Precipitación isoeléctrica de las proteínas, y posterior separación de las mismas del resto de las moléculas solubles mediante centrifugación. Las proteínas extraídas son precipitadas, llevando la solución al pH correspondiente al pI. Este pH suele estar entre valores de 4-5 (Vani & Zayas, 1995). La crema proteica resultante se lava de una a tres veces con agua al mismo pH que el pI, para extraer los compuestos solubles retenidos por adsorción y se centrifuga. Finalmente, el aislado proteico es neutralizado (opcional) (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013) y secado.
- b) Ultrafiltración. Mediante este sistema las moléculas solubles no proteicas, de bajo peso molecular, atraviesan la membrana y constituyen el permeado, mientras que las proteínas de mayor peso molecular son retenidas. El retenido final se suele dializar para eliminar las pequeñas moléculas solubles y el permeado, se puede someter a ósmosis inversa para recircular el agua (Honig *et al.*, 1987). La principal ventaja de esta alternativa es que permite recuperar no solo las proteínas insolubles en el pI sino también las solubles, mientras que su principal inconveniente es el aumento del tiempo global y el coste del proceso.

### 1.2.2. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos.

Actualmente, los aislados proteicos se usan en numerosas aplicaciones alimentarias ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y/o funcionales. Algunas de estas ventajas, según el tipo de producto, aparecen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Principales ventajas en el uso de aislados proteicos.

| Producto                        | Nutricionales | Funcionales | Económicas |
|---------------------------------|---------------|-------------|------------|
| Emulsiones cárnicas             | X             | X           | X          |
| Carne picada                    | X             |             | X          |
| Patés de hígado                 | X             | X           | X          |
| Mariscos triturados             | X             | X           | X          |
| Sucedáneos de queso             |               | X           | X          |
| Postres congelados              | X             | X           |            |
| Sopas y salsas                  |               | X           | X          |
| Fórmulas infantiles             | X             | X           | X          |
| Bebidas nutritivas para adultos | X             |             | X          |
| Suplementos proteicos           | X             | X           | X          |
| Productos de panadería          |               | X           |            |
| Leche de soja                   | X             |             | X          |

Existe una gran variedad de aislados, diseñados específicamente para proporcionar las características deseadas, según el alimento de que se trate. La mayoría de las aplicaciones tienen lugar en alimentos tradicionales que, ya tienen establecidos una serie de parámetros de utilización y calidad. Para tener éxito en estos productos, los aislados deben mantener esta calidad, esto quiere decir igual o similar color, sabor, aroma, textura y composición química y nutricional. La concentración de proteína vegetal añadida a un alimento vendrá dada, por las características

nutricionales y funcionales deseadas, para el producto final por la industria y, sobre todo, por la aceptación de este nuevo alimento por parte del consumidor.

Los aislados proteicos se usan, junto con proteínas de la carne, en hamburguesas y en productos cárnicos emulsionados tales como las salchichas (Su *et al.*, 2000). En Japón, los aislados de soja se utilizan junto con proteínas de pescado en productos tradicionales (Soeda, 1995). Dependiendo de los parámetros económicos y de calidad requeridos, la sustitución de la caseína por aislados puede ser beneficiosa en sucedáneos de quesos, productos de panadería, bebidas y otros productos (Blenford, 1996; Erdogdu-Arnoczky *et al.*, 1996; Shepherd *et al.*, 2000).

El incremento del valor nutricional del producto es, la principal razón para el uso de los aislados en carnes magras, fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos proteicos (Kumomura, 2000). En productos de carne magra, beneficia a personas con un alto nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, al disminuir el contenido en grasas del producto (Muguerza *et al.*, 2001). Las fórmulas infantiles basadas en los aislados, se elaboran para proporcionar una nutrición completa, que cubra las necesidades proteicas en niños que no puedan consumir una dieta equilibrada, debido a problemas de alergia alimentaria o de intolerancia a la lactosa (Li *et al.*, 2013). Las principales ventajas de las bebidas nutritivas para adultos son la flexibilidad de formulación y los efectos hipolipidémicos (Kumomura, 2000). En el caso de los suplementos proteicos, se utilizan para el control dietético, así como para enriquecer en proteínas el producto (McMichael-Phillips *et al.*, 1998). En todo caso, igual que con los alimentos tradicionales, los beneficios nutritivos tienen que ir acompañados de una calidad funcional adecuada, para que sean aceptados por el consumidor.

En un gran número de aplicaciones, los aislados proteicos se usan tanto por sus propiedades nutricionales como funcionales. Se emplean para aclarar el color, mejorar la textura de carnes de aves deshuesadas mecánicamente, y para unir piezas intactas de músculos (Petracci *et al.*, 2013). En la formulación de emulsiones alimentarias de tipo mayonesa o salsas para ensaladas, se ha empleado tradicionalmente la yema de huevo como emulsionante. Sin embargo, debido a la tendencia del consumidor a

eliminar productos que contengan colesterol, se estudian actualmente emulsionantes alternativos, entre los que se encuentran las proteínas vegetales (Dickinson & Casanova, 1999). Muchos alimentos procesados son espumas. Entre ellos cabe citar la nata batida, helados, tartas, merengues, pan, soufflé, mousse y otros. Las singulares propiedades texturales y sensación bucal de estos productos derivan de sus finas burbujas de aire dispersas. En la mayor parte de estos productos, los agentes estabilizadores son las proteínas (Foegeding *et al.*, 2006). También proporcionan textura a las salchichas y mejoran la funcionalidad de los patés. Los aislados aumentan la absorción de agua y mejoran la textura de los productos de panadería (Tomoskozi *et al.*, 2001).

En los últimos años, las especies de altramuz dulce han cobrado importancia en la alimentación humana, además del grano salmuerado tradicionalmente conocido, cuando la proteína de la harina de altramuz es extraída, el aislado proteico resultante libre de alcaloides puede usarse como alimento para la mejora de las propiedades funcionales. Así, se ha probado con éxito como ingrediente de diversos productos alimentarios como magdalenas, en el que han sido sustituidas las proteínas del huevo (Salem & Hanan, 2012) y, en una gran variedad de productos con un mayor contenido de proteínas tales como lácteos y, productos de panadería y cárnicos (Drakos *et al.*, 2007).

Sin embargo, los aislados proteicos presentan dos grandes limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria, como son, su baja solubilidad y la potencial alergenicidad de algunos de sus componentes.

Estas razones, junto con la demanda de nuevos alimentos, han llevado al desarrollo de procesos de hidrólisis proteica de diversos vegetales como soja (Tsumura *et al.*, 2005), arroz (Fiocchi *et al.*, 2003), guisante (Swiatecka *et al.*, 2010), colza (Vioque *et al.*, 2001a) girasol (Bautista *et al.*, 2000) o lenteja (Cabanillas *et al.*, 2010), entre otros.

### **1.3. Hidrolizados proteicos vegetales.**

La hidrólisis proteica es la rotura de los enlaces peptídicos y, en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño e incluso de aminoácidos libres. La hidrólisis de las proteínas se produce durante la digestión gastrointestinal, por fermentación o maduración durante el procesamiento de alimentos y, por procesos de hidrólisis controladas utilizando proteasas exógenas (Pedroche *et al.*, 2007).

La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases) o biológicos (con enzimas). Hoy día apenas se utiliza la hidrólisis química, debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos y se forman compuestos tóxicos como la lisinoalanina. Por el contrario, la hidrólisis enzimática utiliza una proteasa para romper los enlaces peptídicos y, se realiza en condiciones más suaves de pH y temperatura, que van a reducir la formación de compuestos indeseables (Guadix *et al.*, 2000). Además, se mantiene el valor nutritivo de la proteína de origen, ya que no se produce degradación de los componentes hidrolizados.

La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis dependerá de la concentración de sustrato, de la relación enzima/sustrato, del tiempo de incubación, de las condiciones de pH y temperatura, y de la naturaleza de la enzima (Vioque *et al.*, 2001a).

En las industrias de producción de alimentos más del 60% de las enzimas utilizadas son proteasas (Arreozola *et al.*, 2011), siendo las principales aplicaciones, la elaboración de la cerveza, maceración de cereales, la fabricación de queso y la producción de hidrolizados de proteínas (Ward, 2011). Las proteasas pueden clasificarse de diversas maneras, atendiendo a su origen o su actividad catalítica (Arreozola *et al.*, 2011):

Según su origen, las proteasas pueden clasificarse en diferentes grupos:

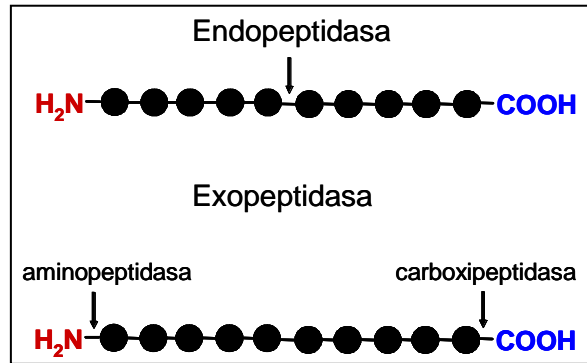
1. Proteasas animales: la familia de las proteasas de origen animal incluyen la tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y renina. Son producidas puras en cantidades industriales, aunque su producción depende de la disponibilidad del ganado para su sacrificio, debido a que son extraídas del páncreas de éstos.
2. Proteasas vegetales: la papaína es un ejemplo de proteasa de plantas comúnmente utilizada en la industria, se extrae de la cáscara de la fruta *Carica papaya*. Otro ejemplo típico de proteasas de plantas es la bromelaína, que es extraída del tronco y del jugo de la piña. La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza, que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento (Eliécer, 2003). Sin embargo, el uso de las plantas como fuente de proteasas, está influenciado drásticamente por factores como la disponibilidad de suelo para cultivo y las condiciones climáticas necesarias para el desarrollo y la producción (Rao *et al.*, 1998).
3. Proteasas bacterianas: proteasas bacterianas neutras y alcalinas son producidas comercialmente por organismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas neutras de origen bacteriano tienen actividad en un rango de pH de 5 a 8. Su baja termotolerancia es favorable para el control de la actividad durante la producción de hidrolizados con baja degradación por hidrólisis. Las proteasas bacterianas alcalinas se caracterizan por tener actividad a pH 10 y amplia especificidad por sustratos, su temperatura óptima está alrededor de 60° C (Rao *et al.*, 1998).
4. Proteasas fúngicas: actualmente una gran proporción de las proteasas comerciales son derivadas de cepas de origen fúngico. El uso de hongos filamentosos para la producción de proteasas tiene una gran ventaja, son productores de enzimas extracelulares de fácil recuperación empleando

fermentación en medio líquido, una tecnología ambientalmente sostenible, pues pueden utilizarse sustratos biodegradables (Arreozola *et al.*, 2011).

Las primeras enzimas proteolíticas usadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano y fúngico. Esto es debido a que las proteasas microbianas tienen un rápido crecimiento, bajo coste de producción, y pueden ser modificadas genéticamente, para generar cepas con un alto rendimiento de producción de enzimas, más eficientes y con las propiedades requeridas para las diversas aplicaciones (Shankar *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Bacillus* spp y cepas fúngicas como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp., son las más utilizadas para la producción de proteasas (Sandhya *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2008).

Según su actividad catalítica, encontramos distintos tipos de proteasas:

1. Endopeptidasas: son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína dando como resultado cadenas de péptidos.
2. Exopeptidasas: actúan sobre enlaces terminales de una proteína, basándose su sitio de acción sobre el N o C terminal, dando como resultado aminoácidos libres. Las que actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido, reciben el nombre de aminopeptidasas y, las que actúan sobre el carbonilo terminal de la cadena polipeptídica son carboxipeptidasas.



**Figura 7.** Clasificación de las proteasas según su actividad catalítica.

La endoproteasa Alcalase 2.4 L, cuyo componente principal es Subtilisin A, es producida a partir de *Bacillus licheniformis* y fue descubierta en 1947 por Liderstrom, Lang y Ottesen en el laboratorio Carlsberg (Copenhague, Dinamarca). Es una de las enzimas con mayor facturación mundial (Rao *et al.*, 1998). Su amplia utilización es debida a varios factores: su actividad hidrolítica óptima se encuentra comprendida en un rango de pH suave (7-10) y su temperatura entre 50 y 70° C, lo que es de gran interés para evitar la contaminación en el proceso, al impedir el crecimiento bacteriano. Tiene un amplio espectro de especificidad, y es totalmente soluble en agua cumpliendo con las especificaciones recomendadas por la FAO/OMS (Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización Mundial de la Salud), JECFA (Joint Expert Committee on Food Aditives) y FCC (Food Chemicals Codex) relativas a enzimas de uso alimentario. Esta enzima se ha utilizado con éxito para mejorar las propiedades bioactivas de proteínas animales (Ahn *et al.*, 2012) y vegetales (Siow & Gan, 2013).

Entre las enzimas específicas, una de las más utilizadas es la tripsina. La endoproteasa tripsina es la principal enzima digestiva del intestino, es la responsable de la hidrólisis de las proteínas ingeridas en los alimentos. Hidroliza uniones peptídicas en las cuales el grupo carboxilo esté constituido por una lisina o una arginina y, se ha empleado con éxito para la obtención de hidrolizados proteicos con propiedades bioactivas (Pedroche *et al.*, 2007). Existen en la actualidad enzimas experimentales y comerciales de origen microbiano con actividad tripsina. Un ejemplo de estas es Izyme



AL, comercializada por Novozymes y que se emplea cuando se busca un grado de hidrólisis moderado.

Las principales fuentes proteicas para la elaboración de hidrolizados proteicos han venido siendo la caseína, el lactosuero y el huevo. Estas proteínas de origen animal, son consideradas de alto valor nutritivo, por contener proporciones de aminoácidos esenciales que se ajustan especialmente a las necesidades humanas. En la actualidad, se están planteando limitaciones, debido a que existe una elevada preocupación por la aparición de focos víricos esporádicos en carnes de animales, así como restos de sustancias químicas o farmacológicas empleadas en los piensos. Todo ello está potenciando el uso de proteínas vegetales, principalmente leguminosas como haba, garbanzo y altramuz, y subproductos de las industrias extractoras de aceite como las harinas desengrasadas de soja, colza, y girasol.

#### **1.4. Tipos y aplicaciones de los hidrolizados proteicos en la alimentación.**

Los hidrolizados proteicos vegetales que se producen para ser utilizados en alimentación, se pueden dividir en tres grandes grupos dependiendo de su grado de hidrólisis:

*a) Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales.*

Las propiedades funcionales pueden definirse como aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Lamsal *et al.*, 2007).

Las proteínas, en su forma nativa, presentan buenas propiedades funcionales como solubilidad, emulsificación, gelificación y formación de espumas teniendo muy diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Tabla 5). No obstante, estas

propiedades varían con el pH, siendo peores a pH cercanos o iguales al punto isoeléctrico (pI) (Yust *et al.*, 2010). La mayoría de los alimentos procesados presentan un pH ácido, similar al pI de las proteínas, por lo que la aplicación de éstas en la industria alimentaria está limitada.

**Tabla 5.** Propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos y su aplicación.

| <b>Propiedad</b>           | <b>Aplicación</b>  |
|----------------------------|--|
| <b>Emulsificación</b>      | Carnes, sucedáneos de leche, aliños de ensalada  |
| <b>Retención de agua</b>   | Jamón cocido, platos preparados  |
| <b>Viscosidad</b>          | Bebidas, masas   |
| <b>Gelatinización</b>      | Salchichas, postres de jalea, quesos   |
| <b>Espumación</b>          | Merengues, bizcochos   |
| <b>Unión por cohesión</b>  | Productos texturizados, masas  |
| <b>Absorción de aceite</b> | Salchichas, derivados cárnicos y lácteos   |
| <b>Solubilidad</b>         | Bebidas (alimentos nutritivos para deportistas, dietas para adelgazar, té instantáneo) |

La hidrólisis enzimática de las proteínas, conduce a una disminución en el peso molecular de los productos de reacción, un incremento de grupos ionizables y a la exposición de grupos hidrofóbicos originalmente ocultos en el interior de la proteína intacta. Todo ello resulta en cambios estructurales y reológicos que, afectarán directamente a las propiedades de los hidrolizados obtenidos (Lamsal *et al.*, 2007). Se ha demostrado que una hidrólisis limitada (menor del 10%), mejora ciertas propiedades funcionales de la proteína original como la solubilidad, capacidad emulsificante, espumante y absorción de agua y aceite (Vioque & Millán, 2005).

*b) Hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como sustancias flavorizantes.*

En su estado natural las proteínas no contribuyen químicamente a la formación de flavor en los alimentos. Sin embargo, los productos procedentes de su hidrólisis, como los péptidos y los aminoácidos libres, sí lo hacen. Por ejemplo, el ácido glutámico es un potenciador del sabor y la glicina y la alanina tienen sabor dulce. Por otra parte, algunos péptidos pueden producir amargor. Pero quizás, el factor principal a la hora de determinar el flavor, sea la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros componentes como azúcares o lípidos. Esta interacción puede producirse mediante reacciones de Maillard, generando compuestos secundarios responsables del olor y el sabor del producto (Eric *et al.*, 2013). Estas reacciones de Maillard están favorecidas por el tratamiento con calor.

Tradicionalmente, los hidrolizados proteicos utilizados como flavorizantes, se han obtenido mediante hidrólisis ácida de proteínas vegetales (2-24 h a 100-125° C). Según la temperatura, el tiempo y la concentración de ácido, varía el grado de hidrólisis y, con él, los atributos sensoriales del producto. La posterior neutralización con hidróxido sódico o carbonato sódico genera una cantidad de sal que es una parte sustancial del producto final. En la actualidad, el tratamiento con ácidos está en desuso por los compuestos no nutricionales que pueden formarse, y se está potenciando el uso de proteasas para la producción de hidrolizados extensivos que, puedan ser utilizados en alimentación como sustancias flavorizantes (Eric *et al.*, 2013).

Estos hidrolizados son un ingrediente habitual para productos como sopas y platos precocinados. También se emplean en la producción de cubitos de caldo, salsas y en derivados cárnicos.

*c) Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada.*

En este apartado se encuentran los hidrolizados que buscan mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen. Estos hidrolizados podrían dividirse a su vez en dos grandes grupos: aquellos que pueden ser usados como

suplemento proteico en la dieta e hidrolizados con una composición definida, para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos como fenilcetonuria, alergias alimentarias, o enfermedades hepáticas (Clemente, 2000).

Los factores que favorecen el uso de hidrolizados como suplemento proteico son, desde un punto de vista funcional, su elevada solubilidad, que permite su utilización en alimentos líquidos y, desde un punto de vista nutricional, el hecho de que la absorción gastrointestinal de los péptidos que componen el hidrolizado, principalmente di y tripéptidos, parece ser más efectiva en comparación con las proteínas intactas o incluso aminoácidos libres (Roberts *et al.*, 1999; Boza *et al.*, 2000).

Sin embargo, ha sido en los últimos años cuando han crecido las aplicaciones comerciales de los hidrolizados proteicos vegetales, en la elaboración de alimentos líquidos o bebidas energéticas, en la producción de alimentos hipoalergénicos y de desarrollo de las dietas médicas de enfermedades específicas (Clemente, 2000). Por ejemplo, podemos citar su uso en la alimentación de la tercera edad debido, a la pérdida de apetito que se produce en las personas ancianas, causada por diversas razones, como factores sociales o la falta de ejercicio. Esta pérdida de apetito puede generar una malnutrición, que está relacionada con un incremento de enfermedades y mortalidad. Para estas personas, comer más no es la solución idónea dada la falta de apetito, pero la demanda de proteínas necesarias podría cubrirse con bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos, ya que su ingesta es más atractiva que la de alimentos sólidos. El uso de los hidrolizados proteicos como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos es de vital importancia. Estas dietas entéricas, se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y, son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de mal absorción-mal nutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos. Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son: no producir desequilibrios osmóticos ni alergias, presentar un alto valor nutritivo no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor aceptable. En este apartado,

también puede incluirse la alimentación parenteral en casos de hospitalización. Otro campo de aplicación es la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia, como ciclismo o fondo, o aquellos que requieren un desarrollo muscular importante, como halterofilia o culturismo. En este sentido, las bebidas refrescantes complementadas con péptidos pueden tomarse durante el ejercicio o tras su finalización (Van Loon *et al.*, 2007). En lo que a nutrición deportiva se refiere, los hidrolizados proteicos por lo general se producen a partir de suero de leche o caseína (Manninen, 2009).

Respecto a las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición, ha sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos. La alergia alimentaria es un problema que no se le ha prestado mucha atención, a pesar de que en los últimos años son cada vez más las personas afectadas. Las consecuencias de una reacción alérgica, pueden ir desde pequeños trastornos físicos hasta la muerte por shock anafiláctico. Hoy día no existe ninguna medicación para prevenir las alergias alimentarias. De hecho, evitar estos alimentos de manera estricta es la única forma de impedir la reacción alérgica. Otra posibilidad es tomar dietas constituidas por hidrolizados proteicos hipoalergénicos. La alergenidad de una proteína está directamente relacionada con su secuencia aminoacídica y su conformación espacial. Mediante procesos de hidrólisis enzimática se han obtenido productos en los que se ha reducido la alergenidad de las proteínas de origen en más del 90% (Reche *et al.*, 2010). También se ha propuesto el uso de hidrolizados proteicos con una composición definida para, el tratamiento de enfermedades o situaciones muy concretas (Mahmoud & Cordle, 2000). Este es el caso de errores metabólicos congénitos, como la fenilcetonuria o tirosinemia. Se proponen hidrolizados sin los aminoácidos aromáticos que estos enfermos no pueden metabolizar, fenilalanina y tirosina respectivamente (Cabrera-Padilla *et al.*, 2009). Debido a su buena solubilidad, digestibilidad y absorción intestinal, los hidrolizados extensivos también son usados en la alimentación de enfermos de Crohn, enfermedad del hígado o colitis ulcerosa (Clemente, 2000). También se ha propuesto el uso de hidrolizados proteicos para el tratamiento de encefalopatías hepáticas. En estos casos,

son necesarios, alimentos enriquecidos en los aminoácidos ramificados valina, isoleucina y leucina y pobres en aromáticos, tirosina y fenilalanina (Pedroche *et al.*, 2006).

## **1.5. Alimentos funcionales.**

### **1.5.1. Definición y tipos de alimentos funcionales.**

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón. En los años 80, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta que para controlar los gastos sanitarios, generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana, había que garantizar también una mejor calidad de vida. En Europa, ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer la relación que existe entre la dieta y la salud. Hoy en día, la gente reconoce que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, y a mantener el estado de salud y bienestar. No existe hasta el momento una definición legal de alimento funcional, y la propuesta en el documento de consenso “Functional Foods Science in Europe” (FUFOSE) en 1999 es la más aceptada. Se considera que un alimento es funcional si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermar. (Vidal, 2008).

Existen diferentes vías de desarrollo de alimentos funcionales: fibra, probióticos, prebióticos, simbióticos e ingredientes con funcionalidad biológica que pueden ser de naturaleza lipídica, proteica y otros ingredientes funcionales (Olagnero *et al.*, 2007; Boye *et al.*, 2010; Alabdulkarim *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha reconocido que la proteína de la dieta es, una buena fuente de péptidos bioactivos con un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo antioxidantes, antihipertensivos, opioides e inmunoestimulantes (Hartmann & Meisel, 2007). Las leguminosas constituyen una fuente importante de proteínas en la dieta. En este sentido, se ha venido investigando la presencia de diferentes péptidos con actividad biológica en proteínas de diversas legumbres como soja, garbanzo y altramuz (Gibbs *et al.*, 2004; Kou *et al.*, 2013; Boschini *et al.*, 2014).

### **1.5.2. Declaraciones de propiedades saludables.**

El Reglamento CE Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos establece, las condiciones y requisitos que deberán seguirse por parte de la industria alimentaria, para poder afirmar que un alimento contiene determinadas propiedades saludables. Sin duda constituye un avance importante en la regulación de la publicidad y etiquetado de los alimentos. Es una normativa de obligada aplicación en cada Estado, siendo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la responsable de evaluar las bases científicas sobre las que se pretendan sustentar las alegaciones sobre propiedades saludables. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), responsable de la aplicación coordinada del Reglamento, participa con la EFSA en la evaluación de las bases de alegaciones, particularmente las que se planteen desde la industria alimentaria española. Según AESAN una “declaración de propiedades saludables” es cualquier declaración que afirme, sugiera o de a conocer que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud. ([http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena\\_alimentaria/detalle/tipos\\_declaraciones.shtml](http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/detalle/tipos_declaraciones.shtml)).

En el citado Reglamento CE Nº 1924/2006 se han establecido los siguientes tipos de declaraciones de propiedades saludables:

**Artículo 13:** *Declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad.*

-Declaraciones bajo el artículo 13.1.

Referidas a la función de un nutriente o de otra sustancia en el crecimiento, el desarrollo y las funciones corporales, o las funciones psicológicas y comportamentales, o sin perjuicio a la Directiva 96/8/CE, en el adelgazamiento, el control de peso, a una disminución de la sensación de hambre, a un aumento de la sensación de saciedad, o a la reducción del aporte energético de la dieta, siempre que se basen en pruebas científicas generalmente aceptadas, y sean bien comprendidas por el consumidor medio.

-Declaraciones bajo el artículo 13.5.

Se trata de solicitudes para la adición de declaraciones a la lista comunitaria de declaraciones saludables bajo el artículo 13.1, indicada en el artículo 13.3 del Reglamento, que estén basadas en pruebas científicas recientemente obtenidas y/o que incluyan una solicitud de protección de datos sujetos a derechos de propiedad industrial, que se adoptarán por el procedimiento establecido en el artículo 18.

Así pues, el panel sobre productos dietéticos, nutrición y alergias de la EFSA, evalúa la sustentación científica que apoya a las solicitudes de las declaraciones saludables, emitiendo una opinión científica que describe las conclusiones de dicha evaluación. Estas opiniones servirán de base a la Comisión Europea y a los Estados Miembros, en los siguientes pasos que son la posible autorización o denegación de las mencionadas declaraciones saludables.

**Artículo 14:** *Declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad.*

-Declaraciones bajo el artículo 14.

Son autorizadas, de conformidad con el procedimiento establecido en los artículos 15, 16, 17 y 19 del Reglamento, y a su vez se clasifican en declaraciones:



a) Relativas a la reducción de factor de riesgo de una enfermedad.

Es cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a conocer que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

b) Relativas al desarrollo y salud de los niños.

En estos casos, de nuevo el panel sobre productos dietéticos, nutrición y alergias de EFSA, evalúa la sustentación científica que apoya a las solicitudes, emitiendo una opinión que servirá de base a la Comisión Europea y a los Estados Miembros, en los siguientes pasos que son la posible autorización o denegación de las mencionadas solicitudes.

En base a los artículos 13 y 14, se han aceptado recientemente declaraciones de propiedades saludables autorizadas como el concentrado de tomate soluble en agua I y II que contribuye a mantener la agregación de plaquetas normal, favoreciendo una buena circulación sanguínea (según el artículo 13.5) y/o fitoesteroles y los ésteres de fitoestanol que disminuyen/reducen el colesterol sanguíneo (según el artículo 14). Sin embargo, no existe ninguna declaración de propiedad saludable referida a proteínas y péptidos.

### **1.5.3. Péptidos bioactivos.**

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta, pero que pueden ser liberados bien, durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o, por un procesado previo del mismo, como por ejemplo mediante hidrólisis enzimática (Vioque *et al.*, 2000). Por tanto, las características nutricionales de una proteína determinada, no se limitarían solo al aporte de nitrógeno y energía que representan y, a los contenidos en aminoácidos esenciales, sino que también habría que considerar la presencia de péptidos bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas, durante

el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal, ejerciendo diversas funciones metabólicas.

Las características estructurales, hidrofobicidad, basicidad, así como la composición y secuencia de los aminoácidos, juegan un papel fundamental en la actividad de los péptidos bioactivos (Agyei & Danquah, 2012).

A continuación se exponen los principales péptidos bioactivos descritos hasta el momento y sus efectos fisiológicos.

#### *Péptidos opioides.*

Los péptidos opioides son ligandos de receptores de opioides con actividades agonistas o antagonistas (Pihlanto, 2011). Los péptidos opioides derivados de proteínas de los alimentos, como el trigo y la leche tienen una estructura similar a los péptidos opioides endógenos, con un residuo de tirosina situado en el amino terminal o sitio bioactivo, junto con la presencia de otro residuo aromático, como Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición (Carrasco & Guerra, 2010). Estos péptidos opioides derivados de diversas fuentes alimenticias se han denominado exorfinas. La mayoría de los péptidos opioides penetran a través de la barrera sangre-cerebro, alcanzan sus receptores opioides específicos y diversos sitios de unión endógenos en el tracto intestinal, la sangre, el cerebro, y otros objetivos, e interactúan con una amplia variedad de proteínas como suplementos exógenos a los mecanismos endógenos, bajo condiciones de estrés (Artemova *et al.*, 2010).

#### *Fosfopéptidos.*

A partir de la caseína, la proteína principal de la leche, se liberan *in vivo* o *in vitro* mediante hidrólisis enzimática diversos fosfopéptidos de  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - y  $\beta$ -caseína. Estos fosfopéptidos pueden unirse y solubilizar minerales que han sido considerados como antioxidantes (Laparra *et al.*, 2008) y fisiológicamente beneficiosos en la prevención de la osteoporosis, la caries dental, la hipertensión y anemia (Korhonen & Pihlanto, 2006).

*Péptidos con actividad antioxidante.*

Las especies reactivas de oxígeno, como los radicales aniónicos hidroxilo, peróxido y superóxido, se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas. Una excesiva producción de radicales libres ha sido relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades, como algunos tipo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, y con el proceso de envejecimiento (Chirino *et al.*, 2006).

El daño oxidativo también tiene una gran importancia en los alimentos. Una consecuencia habitual es la peroxidación lipídica que produce rancidez, aparición de sabores inaceptables para el consumidor y disminución de la vida comercial del producto. Para evitar estos efectos negativos, en la industria alimentaria se emplean antioxidantes. Los más utilizados son antioxidantes sintéticos como BHT y BHA, pero debido a que recientemente se ha descrito la posible toxicidad de estos compuestos sobre el organismo humano, se está potenciando la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales. Estos antioxidantes naturales presentan algunas desventajas; su capacidad antioxidante es más baja y la mayoría de ellos (carotenoides, compuestos fenólicos, vitamina E) son insolubles en agua.

Los hidrolizados de proteínas y fracciones de péptidos, se pueden añadir como ingredientes funcionales en los sistemas de alimentos, para reducir los cambios oxidativos durante el almacenamiento. Diversos estudios, se han llevado a cabo para investigar las propiedades antioxidantes de hidrolizados proteicos o péptidos bioactivos a partir de fuentes vegetales. El hidrolizado de gluten de maíz (Li *et al.*, 2008), hidrolizado de proteína de garbanzo (Yust *et al.*, 2012) e hidrolizados proteicos de colza (He *et al.*, 2013) son algunos ejemplos recientes.

*Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.*

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es uno de los principales reguladores de la presión arterial. En primer lugar, ECA forma parte del sistema renina-angiotensina (RAS), y produce la conversión de angiotensina I en un potente vasoconstrictor, la angiotensina II, que también induce la liberación de la aldosterona y

por lo tanto, aumenta la concentración de sodio y la presión arterial. ECA también forma parte del sistema de calicreína-cinina, ya que hidroliza la bradiquinina que tiene una acción vasodilatadora (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Los inhibidores sintéticos de la ECA, como el captopril, tienen multitud de efectos secundarios como hipotensión, altos niveles de potasio, reducción de la función renal, tos, angioedema, erupciones cutáneas y anormalidades fetales (Abbenante & Fairlie, 2005). Esto, ha incrementado el interés en el estudio de compuestos de origen natural que puedan generar en el organismo un efecto hipotensor, sin los inconvenientes de efectos colaterales. Muchos péptidos derivados de proteínas alimentarias se caracterizan por tener un potente efecto inhibidor *in vitro* de la ECA.

Hoy en día las proteínas de leche son la principal fuente de péptidos antihipertensivos (García-Tejedor *et al.*, 2013), aunque este tipo de péptidos han sido también aislados a partir de hidrolizados de proteínas del huevo, del plasma sanguíneo de ganado vacuno, incluyendo más recientemente cereales y leguminosas como el garbanzo o el guisante (Barbana & Boye, 2010).

#### *Péptidos con actividad hipocolesterolémica.*

El colesterol es un importante constituyente de los tejidos vivos ya que, interviene como componente estructural de las membranas biológicas y es el precursor de numerosas hormonas esteroideas y ácidos biliares. No obstante, un incremento del colesterol en sangre, está directamente relacionado con un incremento de las posibilidades de padecer enfermedades cardiovasculares. El tratamiento de la hipercolesterolemia tiene como objetivo fundamental disminuir la morbilidad y mortalidad cardiovascular, que sigue siendo la primera causa de muerte en los países desarrollados (Ascaso, 2010). Los estudios epidemiológicos *in vitro e in vivo* en ensayos en animales y humanos, muestran que las dietas basadas en el consumo de vegetales, pueden tener un efecto hipocolesterolémico y reducir el riesgo de enfermedades crónicas.

El consumo frecuente de legumbres secas, en paralelo con una dieta pobre en grasas saturadas, puede ayudar a controlar la homeostasis de lípidos y en

consecuencia reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Duranti, 2006). Entre las legumbres, la soja y sus fracciones proteicas 7S y 11S son las más estudiadas, debido a su efecto en la reducción de colesterol sérico total y el colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad), a través de la modulación de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (Reynolds *et al.*, 2006). Con respecto al altramuz, se ha visto que posee un efecto sobre el metabolismo del colesterol endógeno y un efecto protector en el desarrollo de esteatosis hepática (Guadagnucci *et al.*, 2012).

#### *Péptidos antitrombóticos.*

La trombosis consiste en la obstrucción local del flujo de sangre por una masa, en algún vaso arterial o venoso, provocando que los tejidos irrigados por este vaso sufran isquemia. Los trombos, resultan de un desequilibrio en la activación de los procesos homeostáticos normales, causando la formación de trombos en tejido vascular no lesionado (Montero-Granados & Monge-Jiménez, 2010).

Los principales péptidos aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestran gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de la k-caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con trombina.

Estos péptidos son conocidos como casoplatelinas, e inhiben la agregación de las plaquetas activadas con adenosín difosfato (ADP) y la unión de fibrinógeno, por un mecanismo dependiente de la concentración (Carrasco & Guerra, 2010).

#### *Péptidos antimicrobianos.*

Los péptidos antimicrobianos presentan propiedades bacteriostáticas y bactericidas atribuidas a su capacidad para quelar hierro o de unirse a superficies bacterianas (Sharma *et al.*, 2011). Estos péptidos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva, lo que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a

la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (Carrasco & Guerra, 2010)

Los péptidos antimicrobianos se derivan, fundamentalmente, de una de las proteínas del suero, la lactoferrina. Ésta, es una glicoproteína capaz de unirse al hierro, presente en la mayoría de los fluidos de los mamíferos, incluyendo la leche (Oda *et al.*, 2013). Se han identificado péptidos antimicrobianos en leche bovina y leche de cabra entre otras (Almaas *et al.*, 2011; Barzyk *et al.*, 2013).

#### *Péptidos inmunomoduladores.*

La inmunomodulación implica la supresión o la estimulación de las funciones inmunes (Udenigwe & Aluko, 2012). Se ha descrito que péptidos de caseína inmunomoduladores, estimulan la proliferación de los linfocitos humanos y la actividad fagocítica de los macrófagos (Philanto, 2011). También, la caseidina, obtenida mediante la digestión con quimosina de la caseína a pH neutro, exhibe actividad *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Oliva & Vega, 2004). Además, péptidos derivados del huevo han mostrado una actividad inmunoestimulante y se han empleado para incrementar las funciones inmunes en pacientes con cáncer (Udenigwe & Aluko, 2012). Otro grupo de péptidos que pueden estar implicados en la estimulación del sistema inmune son los inhibidores de la ECA anteriormente citados, ya que la inhibición de esta enzima favorece la formación de la bradiquinina, capaz de estimular los macrófagos favoreciendo la migración de los linfocitos e incrementando la secreción de linfoquininas (Sharma *et al.*, 2011).

## **1.6. La respuesta inflamatoria.**

### **1.6.1. Definición y factores de riesgo.**

Inflamación (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y, por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (Prasad *et al.*, 2012). Se caracteriza por el aumento del flujo sanguíneo hacia el tejido dañado, provocando el aumento de temperatura, enrojecimiento, hinchazón y dolor. La inflamación a corto plazo o aguda es un intento de protección por el organismo, para eliminar los estímulos nocivos y para iniciar el proceso de curación. A largo plazo, sin embargo, conduce a varios trastornos inflamatorios y enfermedades crónicas (Prasad *et al.*, 2012). La fase aguda se caracteriza por su breve duración, la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La fase crónica se caracteriza por una duración mayor, la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, la fibrosis y la necrosis.

La inflamación crónica está involucrada en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, la presión arterial, la aterosclerosis, la diabetes, la obesidad, trastornos respiratorios, trastornos multiesqueléticos, trastornos gastro-intestinales y trastornos autoinmunes (Barac *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2012).

Las enfermedades crónicas son enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta. La incidencia de enfermedades crónicas o enfermedades no transmisibles ha aumentado rápidamente en todo el mundo. De los 57 millones de muertes en el mundo en 2008, 36 millones (el 63%) se debieron a enfermedades no transmisibles, principalmente enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y

enfermedades respiratorias crónicas. La mitad de muertes fueron de sexo femenino y el 29% era de menos de 60 años de edad. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las defunciones por enfermedades crónicas, 17.3 millones cada año, seguidas del cáncer (7.6 millones), las enfermedades respiratorias (4.2 millones), y la diabetes (1.3 millones). Además, comparten cuatro factores de riesgo: el consumo de tabaco, la inactividad física, el uso nocivo del alcohol y las dietas no saludables. Son la principal causa de mortalidad en todas las regiones excepto en África pero, según las estimaciones actuales, en 2020 los mayores incrementos de la mortalidad por enfermedad no trasmisible corresponderán a ese continente. En los países africanos, se prevé que las defunciones por enfermedad crónica, superarán la suma de las causadas por las enfermedades transmisibles y nutricionales y por la morbilidad materna y perinatal, como causa más frecuente de muerte en 2030. Los datos referentes a la mortalidad y a la morbilidad, revelan el impacto creciente y desproporcionado de la epidemia en los entornos con recursos escasos. Más del 80% de las muertes causadas por enfermedades cardiovasculares y diabetes, y alrededor del 90% de las causadas por enfermedades pulmonares obstructivas, tienen lugar en países de ingresos bajos y medios. Más de los dos tercios de todas las muertes causadas por el cáncer, tienen lugar en países de ingresos bajos y medios. El aumento del porcentaje estimado en la incidencia de cáncer hacia 2030, comparado con 2008, será mayor en los países de ingresos bajos (82%) y medios bajos (70%), en comparación los países de ingresos medios altos (58%) y altos (40%) (OMS, 2011).

Mientras que la edad, el sexo y la predisposición genética son elementos no modificables, existen factores de riesgo que pueden ser aminorados. Tales riesgos incluyen factores conductuales (régimen alimentario, inactividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol), factores biológicos (dislipidemia, hipertensión, sobrepeso e hiperinsulinemia) y por último, factores sociales que abarcan una compleja combinación de parámetros socioeconómicos, culturales y otros elementos del entorno que interactúan entre sí.

Aunque la ciencia moderna ha desarrollado varios medicamentos para el tratamiento de las enfermedades crónicas, la mayoría de estos fármacos son



enormemente caros y están asociados con efectos secundarios graves y aumento de la morbilidad (Prasad *et al.*, 2012).

### **1.6.2. Enzimas implicadas en la ruta inflamatoria.**

La inflamación, es una de las respuestas biológicas complejas del sistema inmunológico de un organismo. En los pasos iniciales, la respuesta de la inflamación está mediada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), cuyo nivel en sangre está elevado en muchos trastornos inflamatorios. La PLA<sub>2</sub> hidroliza el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos de las membranas celulares para producir ácidos grasos libres, en particular ácido araquidónico (AA), y lisofosfolípidos (Yedgar *et al.*, 2006). El ácido araquidónico se metaboliza principalmente por las vías enzimáticas de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX) para producir diversas familias de eicosanoides, como prostaglandinas y leucotrienos. Estos eicosanoides están implicados en el desarrollo de la mayoría de las condiciones patológicas, especialmente en las relacionadas con el proceso inflamatorio (Yedgar *et al.*, 2006).

Existe una estrecha relación entre la inflamación y la coagulación (Levi & Van der Poll, 2005). De hecho, los tromboxanos activan a las plaquetas vecinas y forman un complejo denominado protrombinasa que convierte la protrombina en trombina (Amengual *et al.*, 2004). La trombina es una serinproteasa que tiene un papel central en la hemostasis y la trombosis. Una vez formada, la trombina escinde el fibrinógeno para producir la malla de fibrina del coágulo de sangre. La trombina también activa la transglutaminasa o factor XIII (Jadhav *et al.*, 2011), que entrecruza moléculas de fibrina a través de la formación de cadenas isopeptídicas  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lisina y estabiliza el coágulo mediante la prevención de su hidrólisis por proteasas (Moreno, 2006).

### 1.6.3. Monocitos y macrófagos.

El sistema inmune es el encargado de responder ante cualquier tipo de agresión en el organismo. Tiene su origen en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, timo, y médula ósea) y en su acción, participan una gran cantidad de subtipos celulares (células inmunocompetentes) entre las que se encuentran, monocitos y neutrófilos (Peña-Martínez, 1998) (Figura 8).

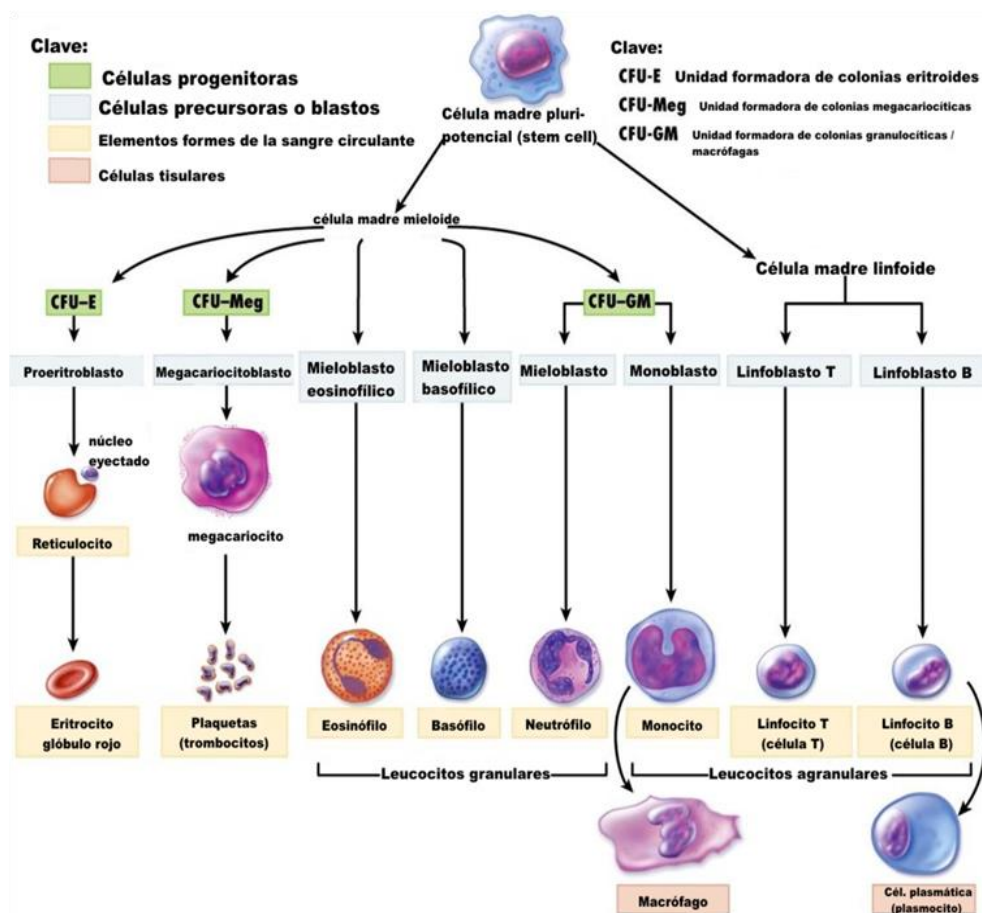


Figura 8. Células del sistema hematopoyético.

La diferenciación hematopoyética tiene lugar en la médula ósea, en el compartimento de células madre o células troncales (stem cells). Son las responsables de formar todas las células y derivados celulares que circulan por la sangre. Los

monocitos se generan en la médula ósea a partir de precursores mielomonocíticos y circulan en la sangre para llegar a los distintos tejidos en condiciones de homeostasis (Figura 8); son los leucocitos de mayor tamaño (~18  $\mu\text{m}$ ) y representan el 10% del total de leucocitos en la sangre (Varol *et al.*, 2009). Se caracterizan por poseer un núcleo (leucocitos mononucleares) en forma de riñón.

Después de 24-72 horas de su permanencia en el torrente sanguíneo, los monocitos lo abandonan y atraviesan el endotelio de los capilares hacia el tejido conectivo (Saad *et al.*, 2011), donde se diferencian a macrófagos o células dendríticas y desempeñan sus funciones relacionadas con la fagocitosis, inflamación, presentación de antígenos, y hemostasia. Los macrófagos son una de las células más estudiadas del sistema inmune, están generalmente en todos los tejidos. En ellos, los macrófagos adquieren sus propiedades morfológicas y funcionales, únicas y diferentes (por ejemplo, células de Kupffer en el hígado y los macrófagos alveolares en los pulmones) (Locati *et al.*, 2013). Un macrófago tiene una vida media de 2-4 meses. En los tejidos existen estímulos que inducen la activación del macrófago (por ejemplo opsoninas, citoquinas y factores de crecimiento), incrementando rápidamente su metabolismo, motilidad y actividad fagocítica (Liu & Yang, 2013).

En respuesta a las citoquinas y productos microbianos, los fagocitos mononucleares se polarizan y expresan distintas propiedades funcionales especializadas. Los macrófagos activados clásicamente (M1) inducidos por interferón (IFN) y/o factor de necrosis tumoral (TNF) muestran un fenotipo tipo Th1, son efectores proinflamatorios y tienen funciones bactericidas, mientras que los macrófagos activados alternativamente (M2), exhiben un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la curación del tejido (Duque & Rojas, 2007). Las citoquinas son los reguladores de las respuestas del huésped a la infección, la respuesta inmune, la inflamación y trauma. Hay dos tipos de citoquinas: proinflamatorias y antiinflamatorias (Barros de Oliveira *et al.*, 2011). Por lo tanto, los inhibidores de las citoquinas proinflamatorias se han considerado como posibles candidatos de fármacos antiinflamatorios (Saad *et al.*, 2011).

Con frecuencia, se utilizan líneas celulares de monocitos de diferentes grados de diferenciación para estudiar la función de los macrófagos, ya que los macrófagos tisulares primarios no se pueden conseguir fácilmente *ex vivo*. El aislamiento requiere la donación de sangre o la recogida de tejido específico por procedimientos invasivos tales como broncoscopia o biopsia de tejido. El número limitado de células, representa una barrera para el uso de estas células primarias, en protocolos que requieren un gran número de ellas, mientras que las líneas celulares monocíticas, tienen ventajas obvias en términos de facilidad de adquisición (Daigneault *et al.*, 2010).

Utilizando líneas inmortalizadas de estas células, se pueden evaluar muchas de las alteraciones que se producen durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Asimismo, una vez producido el daño celular, es posible evaluar la influencia de diferentes agentes farmacológicos o dietéticos. Un modelo bien establecido y ampliamente utilizado para investigar la función biológica de los monocitos, los mecanismos implicados en la diferenciación de los macrófagos y, explorar la regulación de los genes específicos relacionados con las funciones fisiológicas de estas células, es la línea celular monocítica THP-1. En comparación con otras líneas de células mieloides humanas (por ejemplo HL-60, U937, KG-1 y líneas celulares HEL), los macrófagos derivados de THP-1, tienen un comportamiento más parecido al de los macrófagos derivados de los monocitos nativos (Auwerx, 1991; Weldon, 2007). Después del tratamiento con ésteres de forbol (como PMA), se produce un cambio en la morfología de las células THP-1, un aumento de su capacidad de adhesión y la expresión de marcadores de superficies asociados con la diferenciación de macrófagos (Daigneault *et al.*, 2010).



**Figura 9.** Imagen al microscopio electrónico de barrido de un macrófago obtenida del Atlas Digital del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina (Universidad Nacional Autónoma de México).

#### **1.6.4. Influencia de la dieta en la respuesta inflamatoria crónica.**

La alimentación es uno de los principales factores que incide en la modulación de la respuesta inflamatoria que se da en el organismo. A través de diversos efectos sobre las células y sus rutas metabólicas, la alimentación provoca cambios en el normal funcionamiento de los diferentes sistemas involucrados en el proceso inflamatorio. Los fundamentos que explican este efecto de la alimentación sobre la inflamación pueden encontrarse, en parte, en la epigenética que explica cómo agentes externos modifican y determinan la expresión de determinados genes. Otra parte la encontramos, en el efecto que ejercen los alimentos al comportarse como metabolitos celulares, pudiendo actuar como mensajeros intracelulares, pro o antiinflamatorios y también del efecto directo que tienen sobre las células y los tejidos.

(<http://www.idermumbert.com/blog/inflamacion-y-alimentacion/2012>).

En concreto, algunos agentes de la dieta han mostrado potencial para inactivar las moléculas inflamatorias mediante la unión directa. Por ejemplo, la curcumina, un

polifenol presente en la cúrcuma, se une a una variedad de biomacromoléculas, indicando que la curcumina es altamente pleiotrópica con actividad antiinflamatoria, hipoglucémica, antioxidante, cicatrizante, y antimicrobiana (Gupta *et al.*, 2011). Estudios recientes han proporcionado evidencias de que algunos neuropéptidos liberados en nuestro organismo, pueden modificar las funciones de regulación esenciales para los procesos inflamatorios (Fernandes *et al.*, 2009). Existen diversos estudios sobre péptidos antiinflamatorios derivados de la síntesis química (Selvatici *et al.*, 2013). Hasta ahora, las proteínas de la leche se consideran la fuente más importante de péptidos bioactivos (Wada & Lönnerdal, 2014) y se han obtenido hidrolizados proteicos con propiedades antiinflamatorias a partir del suero de leche (Mao *et al.*, 2011). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto de los hidrolizados de proteínas vegetales en los marcadores de inflamación. En este sentido, se ha visto que la hidrólisis de la proteína de soja reduce la expresión de algunos de ellos (Vernaza *et al.*, 2012).

## **2. OBJETIVOS.**





Hoy en día, se reconoce, en gran medida, que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y mantener el estado de salud y bienestar. Muchos alimentos vegetales poseen propiedades biológicas, que los hacen ser considerados como potenciales alimentos funcionales o promotores de la salud. Algunas de estas propiedades se atribuyen a proteínas y péptidos biológicamente activos. Los hidrolizados proteicos constituyen una alternativa a las proteínas intactas y, a las fórmulas elementales en el desarrollo de formulaciones especiales, para proporcionar un soporte nutricional a grupos poblacionales con diferentes necesidades específicas. Éstos, además de su valor nutricional como fuente de aminoácidos, pueden ejercer diversas actividades biológicas (Hartmann & Meisel, 2007). Estos péptidos, una vez purificados o concentrados, podrían utilizarse como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales.

Las proteínas vegetales son menos costosas y, por lo tanto, ofrecen una alternativa valiosa para la producción de péptidos bioactivos derivados de las proteínas de los alimentos (Aluko, 2008). Las legumbres y los cereales son la principal fuente de proteínas vegetales en la dieta humana. Entre las legumbres, soja y altramuz se destacan, por su contenido en proteínas (35-40%) frente a otras, como guisantes o garbanzos que no superan el 30% (Day, 2013), por lo que representan una fuente potencial de péptidos bioactivos.

La inflamación crónica está implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades tales como las cardiovasculares, cáncer, diabetes, obesidad, artritis, enfermedades neurológicas, pulmonares y autoinmunes (Sung *et al.*, 2012). Se cree que la dieta es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de estas enfermedades, por lo que la modificación de la misma podría prevenir o retrasar dichas enfermedades crónicas (Prasad *et al.*, 2012). En la actualidad, se sabe que algunos componentes de la dieta pueden inactivar moléculas inflamatorias y estudios recientes, indican evidencias de que ciertos péptidos, pueden modificar determinadas funciones del proceso inflamatorio (Lang & Kofler, 2011; Onoue *et al.*, 2012).

Diferentes actividades biológicas se han atribuido a las proteínas de altramuz. Aunque las actividades hipocolesterolémicas y antioxidantes han sido las más estudiadas hasta hoy (Yoshie-Stark & Wäsche, 2004; Osman *et al.*, 2011), se ha visto que las semillas ricas en proteínas como el altramuz, disminuyen la glucosa en sangre y mejoran la solubilidad a la insulina en los animales y los seres humanos (Baldeón *et al.*, 2012). Por otro lado, los alimentos a base de proteínas de altramuz dulce están ganando atención por parte de la industria y los consumidores, debido a su posible papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Lee *et al.*, 2009; Belski, 2012), donde la mayoría de los marcadores de riesgo tienen un componente proinflamatorio (Osiecki, 2004). Sin embargo, hasta el momento, no hay informes sobre su actividad antiinflamatoria.

La creciente demanda del consumo de proteína, la preocupación por el aumento de la mortandad debido a enfermedades crónicas y, las recientes investigaciones sobre péptidos antiinflamatorios como lunasina, presente en soja y otras fuentes vegetales (Dia *et al.*, 2009), hacen de las proteínas vegetales una fuente alternativa de proteínas viable para obtención de péptidos bioactivos antiinflamatorios, como medida de control y/o reducción a este problema social y de salud pública.

**Objetivo general:**

El objetivo principal de este proyecto es la obtención de péptidos con actividad antiinflamatoria a partir de harina de altramuz.

**Objetivos específicos:**

1. Obtención y caracterización del aislado proteico de altramuz, que constituye la materia prima para la obtención de los hidrolizados proteicos.
2. Obtención de hidrolizados proteicos de altramuz mediante la hidrólisis del aislado proteico, con las enzimas Alcalase 2.4 L e Izyme AL.
3. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos.
  - a) Ensayos de inhibición *in vitro* de enzimas participantes en el proceso inflamatorio humano: PLA<sub>2</sub>, COX-2, trombina y TG.
  - b) Estudio de la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos en macrófagos derivados de THP-1.
4. Purificación de péptidos con actividad antiinflamatoria.



### **3. APARATOS, MATERIALES Y MÉTODOS.**



### **3.1. Aparatos.**

#### **3.1.1. Microanalizador elemental.**

Las medidas de nitrógeno se realizaron en un microanalizador LECO, modelo CHNS-932 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU). El aparato consta de cuatro detectores individuales, tres de ellos con un sistema de detección por infrarrojos (C, H y S) y uno por termoconductividad diferencial para N, un PC interno compatible con pantalla electroluminiscente sensible al tacto, equipado con un software de operación interactivo CHNS y una balanza analítica micromuestra modelo M2P (Sartorius, Gottingen, Alemania), conectada con el microanalizador.

#### **3.1.2. Reactor de hidrólisis.**

El reactor de hidrólisis utilizado consta de dos bombas peristálticas y un módulo de control de pH, temperatura, agitación y medida digital modelo LAMBDA MINIFOR para volúmenes desde 35 mL hasta 300 mL de la casa LAMBDA Laboratory Instruments (Sihlbruggstrasse, Switzerland).

#### **3.1.3. Equipo de ultrafiltración.**

Se empleó un dispositivo de ultrafiltración tangencial Pellicon XL con una membrana Biomax con corte de peso molecular de 10 kDa de Millipore Corporation (Billerica, MA, EE.UU.).

#### **3.1.4. Equipos de cromatografía líquida.**

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Akta purifier 10 (GE Healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Suiza). El sistema consta de 2 bombas P-900 y un detector de

luz ultravioleta UPC-900. El control del equipo y el procesamiento de datos se realizó mediante el programa Unicorn 5.1 de GE Healthcare.

También se usó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El aparato HPLC Waters 2690 (Waters, Milford, MA, EE.UU.) está equipado con un inyector automático, un detector Waters 2487 ultravioleta-visible y un ordenador personal. El control del equipo, los datos obtenidos y su procesamiento se llevaron a cabo mediante el programa informático Millennium<sup>32</sup> Login versión 3.2.

### **3.1.5. Centrífugas.**

Se emplearon las siguientes centrífugas: Modelo RC5C de Sorvall<sup>®</sup> Instruments (Willmington, DE, EE.UU.) provista de rotores SS-34 y F14S-6-250Y; centrífuga Allegra<sup>™</sup> X-22 R (Beckman Coulter, Brea, California); centrífugas modelo 5415C y modelo 5804 R de Eppendorf, (Hamburgo, Alemania).

### **3.1.6. Incubadores.**

Se empleó un incubador orbital Stuart SI50 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Reino Unido).

Para los cultivos celulares se usó un incubador de CO<sub>2</sub> ThermoForma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> de Thermo Scientific (Vantaa, Finlandia).

### **3.1.7. Espectrofotómetros.**

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro modelo DU-640 Spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE.UU.) equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (UV), con agitación y control de temperatura, y en un espectrofotómetro UV-visible modelo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) que permite cuantificar rápidamente ácidos nucleicos con un consumo de 1-2 µL de muestra.



### **3.1.8. Lectores de microplacas.**

Se empleó un lector de absorbancia en microplacas Multiskan Spectrum de Thermo Scientific. Los datos se procesaron con el programa Multiskan Spectrum (versión 1.0).

Se usó un fluorímetro de microplacas Fluoroskan Ascent<sup>®</sup> de Thermo Scientific. Los datos se procesaron con el programa Ascent Software (versión 2.6).

### **3.1.9. Cabina de seguridad biológica.**

Se empleó una cabina de flujo laminar vertical Bio II A Clase 10 Telstar Life Science solution (Terrassa, España).

### **3.1.10. Equipo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

MJ Mini<sup>™</sup> Personal Thermal Cycler de Biorad (California, EE.UU.).

### **3.1.11. Equipo de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR).**

Para la reacción PCR cuantitativa se usó el Termociclador MX3000<sup>™</sup> de Strategene (La Jolla, CA, EE.UU.).

### **3.1.12. Citómetro de flujo.**

Se utilizó un analizador multiparamétrico de células BD FACSCanto II y software BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.).

### **3.1.13. Otros aparatos.**

Liofilizador modelo Freeze Mobile 3 (Virtis, Gardiner, NY, EE.UU.), atomizador modelo Production Minor con una capacidad de secado de 20 litros/hora (Gea Niro, Copenhague, Dinamarca), rotavapor Hei-VAP Precision HL G1B (Heidolph, Kelheim, Alemania), estufa modelo 201 de la casa Selecta (Barcelona, España), balanza de precisión ( $\pm 0.1$  mg) AJ100 (Mettler, Alemania), microscopio invertido (Olympus CK40, Rochester, NY, EE.UU.), microscopio invertido monitorizado (Olympus IX81, Tokyo, Japón).

## **3.2. Materiales.**

### **3.2.1. Material vegetal.**

Las semillas de *L. angustifolius* fueron cedidas por la empresa Koiposol Semillas S. A. (Sevilla, España).

### **3.2.2. Columnas de cromatografía líquida.**

La cromatografía de fase reversa fue desarrollada mediante una columna Resource 15RPC 3 mL (GE Healthcare).

Para la cromatografía de filtración en gel se usó la columna Superdex™ peptide 10/300 GL (GE Healthcare) constituida por una matriz de agarosa y dextrano que forman una red con un tamaño medio de partícula de 13 µm y con un rango de separación 0.1-20 kDa (GE Healthcare).

Para la cuantificación de aminoácidos se empleó una columna Nova Pack C<sub>18</sub> 4 µm de fase reversa (Waters, Milford, MA, EEUU.) de 300 x 3.9 mm.

### **3.2.3. Patrones de proteínas para cromatografía de filtración en gel.**

Para la calibración de la columna de filtración en gel se utilizaron los siguientes patrones de GE Healthcare: azul dextrano (2000 kDa), ribonucleasa A (13.7 kDa), aprotinina (6.512 kDa) bacitracina (1.423 kDa), y N-Hipuril-Histidil-Leucina-4 · H<sub>2</sub>O (0.501 kDa).

### **3.2.4. Patrones de aminoácidos.**

La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante una solución patrón de la casa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) que contiene 17 aminoácidos en una concentración de 2.5 µmoles/mL (1.25 µmoles/mL en el caso de L-cistina). La

relación completa de estos aminoácidos es: L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-cistina, L-fenilalanina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, y L-valina. El patrón de triptófano fue de Sigma Chemical Co.

### **3.2.5. Enzimas usadas en la determinación del contenido de fibra total.**

Solución al 25% en propilenglicol de  $\alpha$ -amilasa termoestable, solución de glucosa 1 M de amiloglucosidasa y Alcalase 2.4 L de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

### **3.2.6. Enzimas proteolíticas.**

Las enzimas empleadas fueron Alcalase 2.4 L e Izyme AL que fueron cedidas por Novozymes. Alcalase 2.4 L es una endoproteasa, producida a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es Subtilisin A, que muestra una actividad de 2.4 UA (unidades Anson)/g de enzima, siendo definida la unidad Anson como la cantidad de enzima necesaria para digerir hemoglobina en condiciones estándar, produciendo una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético que dan el mismo color con reactivo de Folin que un miliequivalente de tirosina (Anson, 1938). Su temperatura óptima de reacción se sitúa entre 50-60° C y su pH óptimo de acción 6.5-8.5. Cumple con las especificaciones recomendadas por la FAO/OMS relativas a enzimas de uso alimentario.

Izyme AL es una endoproteasa experimental con actividad tipo tripsina (EC 3.4.21.4), es decir, hidroliza enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo pertenece a un residuo de lisina o arginina. Al igual que Alcalase es de grado alimentario.

### 3.2.7. Otros productos.

N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), el ácido 2, 4, 6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), PLA<sub>2</sub> de páncreas bovino, albúmina humana (libre de ácidos grasos), trombina de plasma bovino, antitrombina III (AT III), acetato de tosilo-Gly-Pro-Arg-*p*-nitroanilida (Chromozym), heparina sódica, sulfato de protamina de salmón, transglutaminase (TG) de hígado de cobaya, monodansylcadaverina (dansyl-CAD), carbón recubierto con dextrano, DL-ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol, diclorhidrato de cistamina, COX-2 humana, AA de hígado porcino, N, N, N', N'-tetrametil fenilendiamina (TMPD), flunixin meglumine, hematina porcina, 1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán (MTT), ácido etilendiaminotetracético (EDTA), y reactivo de Griess (1% sulfanilamida en 5% ácido fosfórico y 0.1% naftilendiamina-HCL) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. El sustrato 1-palmitoil-2-piredecanoil fosfatidilcolina (10-pyrene-PC) fue suministrado por Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.). La caseína de leche bovina se obtuvo de Calbiochem (Grupo Merck, Darmstadt, Alemania). Iodoacetamida se adquirió de Merck (Darmstadt, Alemania). El tipo celular empleado fue la línea monocítica THP-1 con número de ATCC<sup>®</sup> TIB-202<sup>™</sup>. El medio utilizado para esta línea, RPMI 1640, el suero fetal bovino (SFB), y la solución de penicilina/estreptomina (P/E) fueron de Gibco<sup>®</sup> (Life Technologies, SA, Alcobendas, España). Dimetil sulfóxido (DMSO), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMPLC), 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA), solución de azul tripán y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-bromuro de difeniltetrazolio fueron comprados a Sigma Chemical Co. La ribonucleasa A fue obtenida de Nacalai Tesque (Japan). iScript cDNA Synthesis Kit fue de Biorad (Hercules, CA, EE.UU.). Anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) Kit fue suministrado por Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania). Brilliant II SYBER Green QPCR Master Mix se obtuvo de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.). Los oligonucleótidos fueron comprados a Eurofins Biolab S.L.U. (Barcelona, España). NucleoSpin RNA II fue obtenido de Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Duren, Alemania). Los Kits ELISA de TNF, IL-1 $\beta$ , e IL-

10 humanas, fueron de Bionova Científica (Madrid, España). Acetonitrilo (ACN) y ácido trifluoroacético (TFA) fueron de Merck Group. El resto de reactivos usados fueron de grado analítico.

### **3.3. Métodos.**

#### **3.3.1. Determinación cuantitativa de proteínas y péptidos.**

El contenido en nitrógeno se determinó mediante microanálisis elemental. La conversión del nitrógeno en proteína se realiza multiplicando por 6.25 como factor de conversión, usando un analizador LECO CHNS-932.

#### **3.3.2. Determinación de cenizas y humedad.**

La humedad se calculó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca a 110° C hasta peso constante (UNE-EN ISO 665:1968). El contenido de cenizas se determinó también por gravimetría, incinerándose las muestras a 550° C durante 36 h (UNE 050:1994).

#### **3.3.3. Determinación de fibra total.**

El contenido en fibra se determinó según Lee *et al.*, (1974). Este método está basado en la digestión de las muestras por las enzimas  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa, y posterior determinación del residuo resultante por gravimetría. Las muestras desengrasadas (1 g) se agitaron en 40 mL de tampón MES 0.05 M, TRIS 0.05 M pH 8.2. Se añadió 50  $\mu$ L de la solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable e incubó con agitación durante 15 min a 95-100° C. Se enfrió a 60° C y añadió 100  $\mu$ L de una solución de 50 mg de proteasa por mL del tampón MES/TRIS, manteniéndola en agitación continua a 60° C durante 30 min. Se añadió 5 mL de HCL 0.56 N y ajustó el pH a 4.0-4.7. Se añadió 300  $\mu$ L de la solución de amiloglucosidasa e incubó con agitación constante a 60° C durante 30 min. Una vez finalizada la digestión, a las muestras se les añadió 225 mL de etanol 96% a 60° C, dejándose precipitar la muestra 1 h a temperatura ambiente. Se filtraron las muestras, lavando el retenido con etanol

78%, etanol 96% y acetona. Al residuo, una vez secado en estufa a 105° C y pesado, se le determinó el contenido en cenizas y proteínas. El porcentaje en fibra total se calculó mediante la siguiente fórmula:

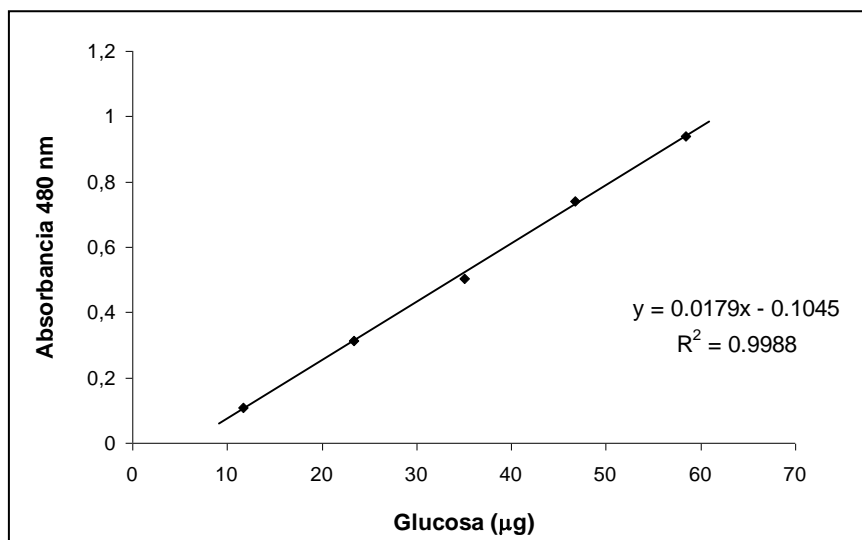
$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Residuo (g)} - \text{Proteínas (g)} - \text{Cenizas (g)}}{\text{Muestra (g)}} \times 100$$

### **3.3.4. Determinación de polifenoles y azúcares.**

Estos dos ensayos se hicieron a partir de un mismo extracto etanólico que se preparó extrayendo las muestras (2-10 g) con etanol 95% en un soxhlet durante 16 h. El extracto se filtró, y se llevó a un volumen fijo (100 ó 200 mL).

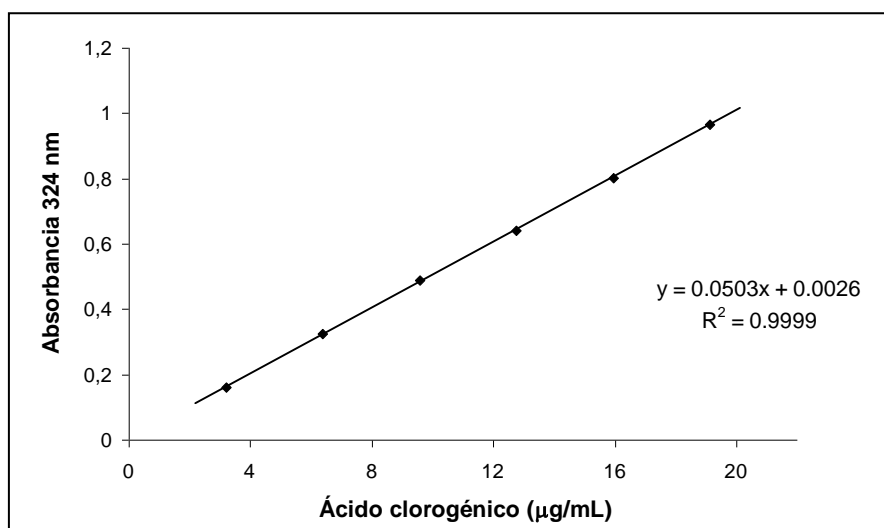
Los azúcares solubles se determinaron según Dubois *et al.* (1956). Este método se basa en la reacción coloreada que tiene lugar entre los azúcares, el fenol y el ácido sulfúrico. Alícuotas del extracto etanólico (100 µL) se llevaron a 1 mL con agua, añadiéndoles 1 mL de fenol al 5% (p/v) en agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 480 nm frente a un blanco. La determinación cuantitativa se hizo mediante una recta de calibrado preparada a partir de una solución de 10.3 mg de glucosa por mL. Los contenidos en azúcares solubles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento p/p. (Figura 10).





**Figura 10.** Recta de calibrado de azúcares solubles.

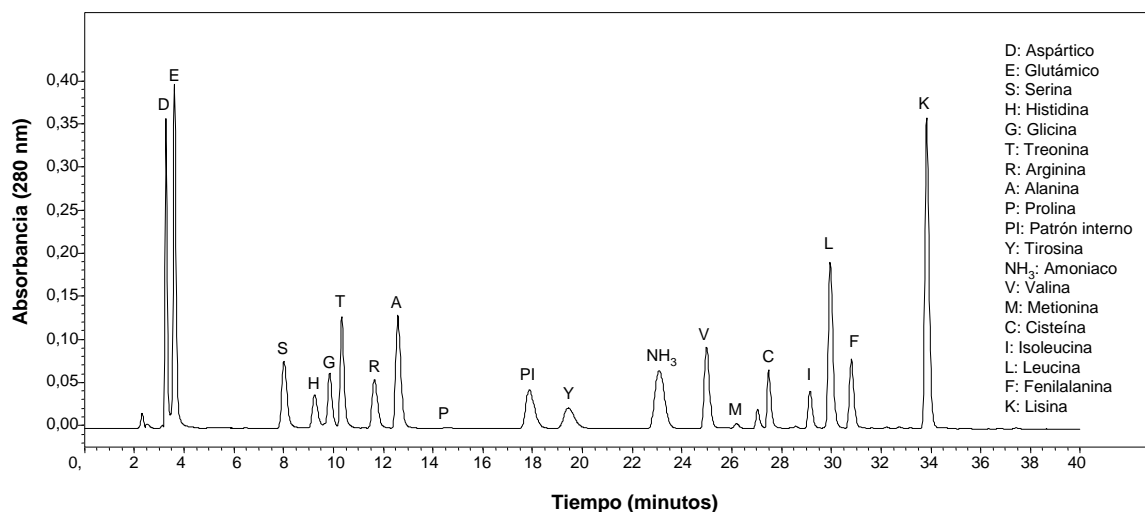
El contenido en polifenoles de las muestras se determinó según el procedimiento de Moores *et al.* (1948) que cuantifica los polifenoles a partir de su absorbancia a 324 nm. La recta de calibrado se hizo usando una solución patrón de ácido clorogénico con una concentración de 0.74 mg/mL. Los contenidos en polifenoles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento p/p. (Figura 11).



**Figura 11.** Recta de calibrado para la determinación de polifenoles.

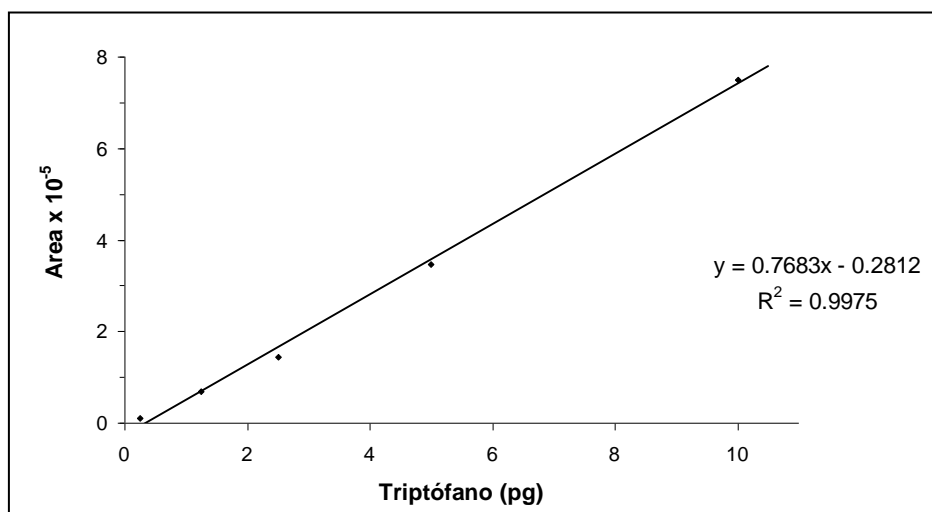
### 3.3.5. Determinación cuantitativa de aminoácidos.

Se llevó a cabo mediante el método publicado por Alaiz *et al.* (1992). Las muestras (2-4 mg de proteína) se hidrolizaron con 4 mL de HCL 6 N a 110° C durante 24 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en el rotavapor y se redisolviéron en tampón borato sódico 1 M, pH 9, llevándolas a un volumen final de 25 mL. La derivatización de los aminoácidos se hizo a 50° C, durante 50 min, con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo. La separación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub>, usándose un sistema de gradiente binario con acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% pH 6 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes. El flujo fue de 0.9 mL/min y el gradiente de elución usado: tiempo 0-3 min, gradiente lineal desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3-13 min, elución con A:B (86:14); tiempo 13-30 min, gradiente lineal desde A:B (86:14) hasta A:B (69:31); tiempo 30-35 min elución con A:B (69:31). Como patrón interno se utilizó ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico, calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de rectas de calibrado construidas para cada uno de ellos. Los aminoácidos utilizados para hacer las rectas de calibrado se sometieron a las mismas condiciones que las muestras, para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida. Los resultados se expresaron en tanto por ciento (p/p) (Figura 12).



**Figura 12.** Perfil cromatográfico obtenido tras el análisis de la composición aminoacídica de albúmina sérica bovina (BSA) mediante HPLC.

La determinación del triptófano se realizó por el método de Yust *et al.* (2004). Las muestras (10-15 mg de proteína) se hidrolizaron con 3 mL de NaOH 4 N a 110° C durante 4 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7 usando HCL 12 N. Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 25 mL con tampón borato sódico 1 M, pH 9. El análisis se llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub>, usándose un sistema isocrático binario con tampón acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% (p/v) pH 6 y acetonitrilo como disolventes en relación 91:9, siendo el flujo de 0.9 mL/min. El contenido en triptófano se determinó a partir de una recta de calibrado preparada con L-triptófano (Figura 13).



**Figura 13.** Recta de calibrado obtenida para la determinación cuantitativa de triptófano.

### 3.3.6. Obtención de aislados proteicos de altramuz.

El aislado proteico de altramuz se obtuvo utilizando el método de Lqari *et al.* (2002). La harina de altramuz se extrajo en una relación 1:10 (p/v) con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0.25% (p/v) a pH 10.5 durante 1 h a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 7500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se recuperó y el sólido se extrajo en una relación 1:5 (p/v), en las mismas condiciones de pH, tiempo y temperatura que la primera extracción. Los dos sobrenadantes se llevaron a pH 4.3 y se centrifugaron. Los precipitados se lavaron con agua a pH 4.3 para eliminar restos de sales y otros componentes no proteicos. Finalmente, las proteínas precipitadas fueron atomizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

### 3.3.7. Hidrólisis del aislado proteico de altramuz.

La hidrólisis se llevó a cabo en un biorreactor con agitación y control de pH y temperatura. El aislado se suspendió en agua destilada (10% p/v) y se llevaron a cabo

dos tipos de hidrólisis: una con Izyme AL seguida por Alcalase 2.4 L y otra usando sólo Alcalase 2.4 L. Se utilizaron las siguientes condiciones:

-Hidrólisis con Izyme AL y Alcalase 2.4 L: en primer lugar, el aislado se hidrolizó con Izyme AL durante 1 h a pH 10, 50° C, y E/S = 100 UE/g proteína. Seguidamente, se produjo una segunda hidrólisis con Alcalase 2.4 L a pH 8, 50° C, y E/S= 0.3 UA/g proteína durante 1 h.

-Hidrólisis con Alcalase 2.4 L: el aislado fue hidrolizado con Alcalase 2.4 L durante 1 h a pH 8, 50° C y E/S= 0.3 UA/g proteína.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos, y las enzimas se inactivaron térmicamente (85° C durante 15 min). Los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación a 8000 rpm durante 15 min constituyeron los hidrolizados proteicos de altramuz (HPA). Los hidrolizados obtenidos mediante la acción secuencial de Izyme y Alcalase fueron nombrados como 0I, 15I, 60I, 60I+15A, 60I+30A, 60I+60A. Los HPA obtenidos de la hidrólisis con Alcalase fueron nombrados 0A, 5A, 10A, 15A, 20A, 25A, 30A y 60A. En todos los casos el número indica el tiempo de hidrólisis (min).

### **3.3.8. Determinación del grado de hidrólisis.**

El grado de hidrólisis (GH), definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos respecto al total, se calculó a partir de la determinación de los grupos aminos libres (Adler-Nissen, 1979), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$GH (\%) = (h/h_t) \times 100$$

h: grupo de aminos libres procedentes del proceso hidrolítico.

h<sub>t</sub>: grupos aminos totales del aislado proteico.

La determinación de h<sub>t</sub> se realizó midiendo los grupos aminos libres en una muestra hidrolizada al 100% con HCL 6 N durante 24 h a 110° C.

### **3.3.9. Ensayos de actividad enzimática de Izyme AL.**

La actividad de la enzima experimental Izyme AL fue determinada midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm que acompaña la hidrólisis del sustrato sintético BAPNA. Alícuotas de 100  $\mu$ L de enzima fueron añadidas a 2 mL de tampón carbonato sódico 50 mM, pH 10, conteniendo 20  $\mu$ L de sustrato 100 mM en DMSO. La cantidad de *p*-nitroanilida liberada se calculó tomando un coeficiente de extinción de 9500 L/mol·cm. Una unidad enzimática de Izyme se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en un minuto, en las condiciones descritas.

Todos los ensayos fueron desarrollados en cubetas espectrofotométricas de 1 cm, dispuestas con agitación magnética y termostalizadas a 25° C.

### **3.3.10. Ensayo de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>.**

La actividad de PLA<sub>2</sub> fue determinada in vitro por la medida de la fluorescencia producida tras la hidrólisis del sustrato 10-pyrene-PC (Cunningham *et al.*, 2006). La enzima PLA<sub>2</sub> se disolvió en tampón Tris 50 mM, NaCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, conteniendo albúmina (libre de ácidos grasos) al 0.25% (p/v) pH 7.4, con una concentración final de 0.5 mg/mL. El sustrato (suministrado en cloroformo) se llevó a sequedad en atmósfera de nitrógeno, fue disuelto en etanol y almacenado a -20° C hasta su uso. La solución de sustrato (5  $\mu$ M) se preparó en el mismo tampón usado para la enzima pero sin albúmina. Se midió la fluorescencia generada tras la hidrólisis del sustrato durante 60 min a 25° C, siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de 355 y 420 nm, respectivamente. La concentración de los hidrolizados fue 0.6 mg/mL. Como control positivo se empleó el antiinflamatorio flunixin meglumine a la misma concentración.

**3.3.11. Ensayo de actividad ciclooxigenasa-2.**

La actividad de COX-2 fue determinada según el método descrito por Somvanshi *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Alícuotas de 0.35  $\mu\text{L}$  de COX-2 comercial se incubaron con 5  $\mu\text{L}$  de los hidrolizados (a una concentración de 70  $\mu\text{g}$  proteína/ $\mu\text{L}$ ), y 95  $\mu\text{L}$  de tampón 100 mM Tris, 1 mM EDTA, y 2  $\mu\text{M}$  hematina a pH 8.3 durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se inició al añadir 50  $\mu\text{L}$  de AA 1.6 mM y 50  $\mu\text{L}$  de TMPD 0.8 mM disueltos en el mismo tampón que la enzima pero sin hematina y preincubados durante 30 min a temperatura ambiente. Fueron usados un control sin hidrolizado y un control positivo (1.24 mg/mL flunixin meglumine en el pocillo). La oxidación de TMPD fue determinada espectrofotométricamente a 610 nm durante 21 s.

**3.3.12. Ensayo de actividad trombina.**

La actividad de la enzima trombina fue determinada por el incremento de absorbancia a 405 nm que acompaña a la hidrólisis del sustrato cromogénico Chromozym (Ialenti *et al.*, 2001). Para ello, 50  $\mu\text{L}$  de los hidrolizados (70  $\mu\text{g}$  proteína/mL) se preincubaron durante 1 h con 5  $\mu\text{L}$  de la enzima (0.136  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a temperatura ambiente. Seguidamente, esta mezcla fue resuspendida en 1.45 mL de tampón 50 mM Tris y 150 mM NaCl pH 8.3. La reacción se inició al añadir 0.5 mL de sustrato 0.3 mM. La absorbancia se midió durante 5 min a 405 nm. Como control positivo se usó heparina y AT III. Ésta, es una glicoproteína que inactiva varias enzimas envueltas en la coagulación. La afinidad de la AT III por la trombina es mayor en presencia de heparina. Por esta razón, se incubaron 30  $\mu\text{L}$  de AT III (4.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 15  $\mu\text{L}$  de heparina (3.74 mg/mL) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0.5 mL de sustrato 0.3 mM y se midió la absorbancia. Como control de la reacción se añadió agua en lugar de los 50  $\mu\text{L}$  de los hidrolizados.

### **3.3.13. Ensayo de actividad transglutaminasa.**

La actividad TG se midió según el método descrito por Wu & Tsai (2006), con algunas modificaciones. Este método está basado en la incorporación del sustrato fluorescente dansyl-CAD en caseína mediante la acción de la TG y la separación de las moléculas fluorescentes que no reaccionan. La enzima liofilizada (4.1 U/mg proteína) se disolvió en agua a una concentración final de 1 mg/mL y fue almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  hasta su uso. 3  $\mu\text{L}$  de enzima se añadieron a 3  $\mu\text{L}$  de cada uno de los hidrolizados (70  $\mu\text{g}$  proteína/ $\mu\text{L}$ ) y 24  $\mu\text{L}$  de tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 0.025 % (v/v) pH 7.5 en una microplaca de fluorescencia, y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. A continuación, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de tampón Tris 100 mM, pH 9, DTT 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, 5 mg/ml de caseína y 100 mM dansyl-CAD, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 60  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 2 mM (preparación fresca) y la incubación en hielo durante 2 min. Posteriormente, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de carbón recubierto con dextrano a una concentración de 10 mg/mL. La microplaca se centrifugó a 1000 rpm durante 15 min para capturar el exceso de dansyl-CAD que no había reaccionado. Los sobrenadantes (100  $\mu\text{L}$ ) fueron cuidadosamente retirados y la intensidad de la fluorescencia se midió en un lector de microplacas con longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 535 nm, respectivamente. La actividad enzimática se expresó como la fluorescencia neta por pocillo que refleja la cantidad de producto formado en la reacción. Se utilizó un control negativo sin hidrolizado y un control positivo con 0.54 mg/mL de diclorhidrato de cistamina.

### **3.3.14. Cultivo celular y tratamientos.**

La línea celular monocítica humana THP-1 se cultivó en suspensión utilizando como medio RPMI 1640 suplementado con 1% P/E (v/v) y 10% de SFB (v/v) inactivado por calor. Los monocitos fueron diferenciados y polarizados clásicamente a macrófagos M1 por incubación con PMA (100 nmol/L) durante 4 días. Las células THP-1



estimuladas con PMA (denominadas macrófagos derivados de THP-1) fueron expuestas a medio RPMI (suplementado con 1% de SFB, v/v) durante 24 h y después se trataron con los hidrolizados proteicos elegidos a una concentración de 500 µg/mL de medio RPMI (1% de SFB, v/v) durante 6 h.

### **3.3.15. Medida de la proliferación celular.**

La proliferación celular se midió mediante la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Las células fueron incubadas a 37° C con los hidrolizados proteicos a una concentración final de 100, 300, 500, 700 y 2000 µg/mL durante 18 h. Pasado este tiempo, se añadió una alícuota de 20 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubó a 37° C durante 6 h. A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de DMSO para disolver el formazán y se agitó durante 10 min. La absorbancia se midió a 570 nm usando un lector de microplacas. Como control se usó medio RPMI (1% SFB). .

### **3.3.16. Análisis del contenido de ADN celular.**

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Esta técnica nos permite distinguir las células en las diferentes fases del ciclo celular. Antes del análisis, las células se permeabilizaron y se trataron con un colorante fluorescente que tiñe ADN cuantitativamente, yoduro de propidio (IP). La intensidad de fluorescencia de las células teñidas en ciertas longitudes de onda se correlaciona con la cantidad de ADN que contienen. A medida que el contenido de ADN de las células se duplica durante la fase S, la cantidad relativa de células en la fase G0 y fase G1 (antes de la fase S), en la fase S, y en la fase G2 y la fase M (después de la fase S) se puede determinar, ya que la fluorescencia de las células en la fase G2/M será el doble que la de las células en la fase G0/G1. Para ello, las células fueron expuestas en el medio

RPMI (1% SFB) conteniendo los tratamientos a una concentración de 500 µg/mL durante 24 h. Seguidamente, se fijaron con paraformaldehído al 1% (v/v) en tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 0.5% de saponina durante 5 min a 4° C. Después de centrifugar, se incubaron en PBS conteniendo 5 µg/mL de yoduro de propidio (IP) y 1 mg/mL de ribonucleasa A durante 10 min a 4° C. SFB 1% y SFB 10% se usaron como controles negativo y positivo respectivamente. La intensidad de fluorescencia de las células se analizó mediante citometría de flujo.

### **3.3.17. Viabilidad celular.**

Se llevó a cabo mediante el método de exclusión de azul tripán. Se trata de un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana y permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. Sin embargo, el azul tripán atraviesa la membrana de las células muertas, y aparecerán coloreadas de azul bajo el microscopio.

Las células fueron tratadas con los hidrolizados a distintas concentraciones: 100, 300, 500, 700, 1000 ó 2000 µg/mL durante 24 h. A continuación se lavan con PBS y se tiñen con el azul tripán. Al menos 200 células fueron contadas para evaluar las células vivas/muertas. El número de células viables fue cuantificado por microscopía. Como control se usó el medio RPMI (1% SFB).

### **3.3.18. Medida de la apoptosis.**

El estudio de apoptosis se llevó a cabo mediante citometría de flujo para discriminar entre apoptosis y necrosis celular en macrófagos derivados de THP-1 después de la exposición con los HPA (500 µg/mL) durante 24 h. Para ello, las muestras se tiñeron con un kit que contiene anexina V-FITC y IP. La anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la

cara interna de la membrana plasmática y es expuesto hacia la cara externa cuando comienza el proceso de apoptosis. Al encontrarse unida a FITC, se excita con luz azul a 490 nm y emite a 530 nm con fluorescencia verde. El IP es un agente intercalante de ADN que emite fluorescencia en rojo cuando es excitado a 488 nm. Una vez unido a ácidos nucleicos, su fluorescencia aumenta de 20 a 30 veces. Este ensayo permite separar y contabilizar las poblaciones de células apoptóticas y necróticas frente a las células vivas usando un citómetro de flujo.

### 3.3.19. Extracción de ARN y análisis mediante PCR.

Los niveles de ARNm de los genes específicos se determinaron usando un sistema de PCR en tiempo real. El ARN total fue extraído a partir de los macrófagos derivados de THP-1 utilizando el kit Nucleospin® RNA II, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se evaluó utilizando la relación OD260:OD280 determinada por un espectrofotómetro NanoDrop.

Un microgramo de ARN total fue sometido a RT-PCR para obtener ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para cada QPCR, se añadieron 10 ng de ADNc de molde al Master Mix Brilliant SYBR Green QPCR que contiene pares de oligonucleótidos para TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL18, receptor de quimiocinas CC tipo 2 (CCR2), quimioquinas CC ligando 2 (CCL2) e IL10. Los genes HPRT y GAPDH se utilizaron para corregir las diferencias de concentración entre las muestras de RNA.

La secuencia de los oligonucleótidos que se utilizaron en este estudio son las siguientes: TNF (NM\_000594.3): 5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3' y 5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCTT-3'; IL-6 (NM\_001001928): 5'-GTTTGAGGGGGTAACAGCAA-3' y 5'-GCTAACTGCAGAGGGTGAGG-3'; IL-1 $\beta$  (NM\_138712): 5'-GCTGTGCAGGAGATCACAGA-3' y 5'-GGGCTCCATAAAGTCACCAA-3'; CCL18 (NM\_002957): 5'-GGGTTTTCTCCCTTTCGAG-3' y 5'-GCGTGTCCTTTCCACAAT-3'; CCR2 (NM\_001002): 5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3' y 5'-ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3'; CCL2 (NM\_002982.3): 5'-CCCCAGTCACCTGCTGTTAT-3' y 5'-TGGAACTCTGAACCCACTTC-3'; IL10 (NM\_000572.2): 5'-GTTCTTTGGGGAGCCAACAG-3' and 5'-

GCTCCCTGGTTTCTCTTCCT-3'; HPRT (NM\_000194.2): 5'-ACCCACGAAGTGTGGATA- 3' y 5'-AAGCAGATGGCCACAGAACT-3'; y GAPDH (NM\_002046.4): 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' y 5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3'.

Para el cálculo de los niveles de expresión de los genes se empleó el método estándar  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando como control endógeno (normalizador o "housekeeping") los genes HPRT y GAPDH. La determinación de los niveles de expresión de cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se encuentran expresados como la media  $\pm$  SD.

### **3.3.20. Ensayo de migración.**

Para estudiar la capacidad migratoria de los macrófagos derivados de THP-1 se empleó el método descrito por Liang *et al.* (2007). Los pasos básicos implican la creación de un "surco" en una monocapa de células, la captura de las imágenes al principio y a intervalos regulares durante la migración celular hasta que se cierra dicho surco, y la comparación de las imágenes para cuantificar la tasa de migración de las células. El efecto de los tratamientos sobre la capacidad de migración de las células fue examinado y cuantificado por microscopía. Las imágenes se realizaron al principio del ensayo y tras 24 h, para comparar la migración producida en los controles sin tratamiento y en las células tratadas con los hidrolizados.

### **3.3.21. Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA).**

Los niveles de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-10 fueron determinados en los sobrenadantes de los cultivos celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante del Kit ELISA para cada citoquina.

### **3.3.22. Medida del nitrito en macrófagos derivados de THP-1.**

Como indicador de la producción de NO se determinó la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Volúmenes iguales de sobrenadante y reactivo de Griess se mezclaron, y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placa (Green *et al.*, 1981). La cantidad de nitrito se obtuvo a partir de una curva estándar de nitrito de sodio.

### **3.3.23. Purificación de péptidos con actividad antiinflamatoria.**

#### *3.3.23.1. Ultrafiltración.*

El hidrolizado obtenido tras 15 min de hidrólisis con Alcalase se fraccionó a través de una membrana de ultrafiltración con corte de peso molecular de 10 kDa. Las dos fracciones recuperadas se liofilizaron y se nombran como retenido o PM1 (peso molecular > 10 kDa) y permeado o PM2 (<10 kDa).

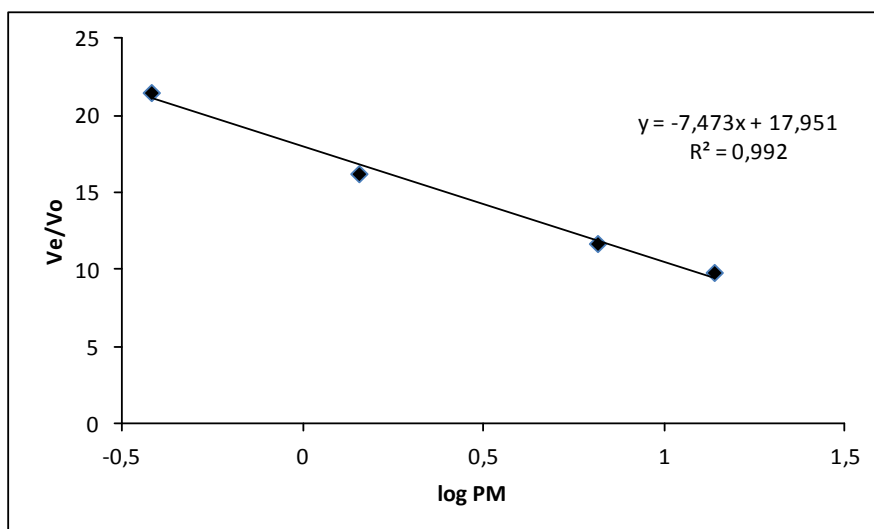
#### *3.3.23.2. Cromatografía de fase reversa.*

La fracción PM2 que exhibió la actividad antiinflamatoria más alta después del proceso de ultrafiltración, se purificó mediante cromatografía de fase reversa, en una columna Resource 15 RPC. El volumen de inyección fue 0.5 mL y la concentración de la muestra 30 mg/mL. La fase móvil comprende dos disolventes: 0.065% TFA, 2% de ACN (A) y 0.05% TFA, 80% ACN (B). La elución se realizó mediante un gradiente lineal de 0% a 100% B en 30 min a un flujo de 3 mL/min. La detección se realizó a 280 nm. Las fracciones recogidas se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno para eliminar ACN y TFA, y se liofilizaron.

### 3.3.23.3. Cromatografía de filtración en gel.

Las fracciones con mayor actividad antiinflamatoria, obtenidas en la cromatografía de fase reversa fueron separadas mediante cromatografía de filtración en gel, en una la columna Superdex™ peptide 10/300 GL. Se inyectaron alícuotas de 0.5 mL de volumen y 10 mg/mL de concentración de la muestra. Como eluyente se empleó 2% ACN, 0.065% TFA, a un flujo de 1 mL/min y se monitorizó a 214 nm. Se recogieron 5 fracciones, se llevaron a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y se liofilizaron.

El peso molecular de los péptidos se determinó a partir de la recta de calibrado obtenida con patrones moleculares de peso molecular conocido a los que se hace referencia en el apartado 3.2.3. de aparatos, materiales y métodos (Figura 14).



**Figura 14.** Recta de calibrado obtenida para la determinación de los pesos moleculares mediante la columna de filtración en gel Superdex-peptide 10/300 GL, siendo PM: Peso Molecular y Ve =volumen de elución (mL).

### **3.3.24. Análisis estadístico.**

Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de tres determinaciones independientes. Las comparaciones entre los grupos estadísticos se realizaron mediante el test one-way ANOVA con post-hoc Holm-Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significativas a  $P < 0.05$ .





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**



#### **4.1. Obtención de aislados proteicos de altramuz.**

En este trabajo, el objetivo principal es la obtención de hidrolizados proteicos de altramuz con actividad antiinflamatoria. Para ello, la preparación de un material que presente un bajo contenido en otros componentes no proteicos, es fundamental para el éxito de las proteasas que se vayan a utilizar, minimizando el número de interacciones que pudieran resultar en la inactivación de dichas enzimas. Es por ello, que se procedió a la obtención de un aislado proteico a partir de la harina de altramuz, realizándose una caracterización química de la misma, con la idea de tener un mayor conocimiento del material vegetal de interés.

La caracterización de la harina de altramuz, mostró una riqueza proteica de 39.91% (Tabla 6) similar a la de soja (Day, 2013), y un alto contenido en fibra (35.41%). El interés en el aprovechamiento de esta proteína vegetal, nos ha llevado a la elaboración de los aislados e hidrolizados proteicos de altramuz (HPA). En la actualidad los aislados proteicos empleados en alimentación son fundamentalmente de soja, un cultivo poco extendido en España. La harina de altramuz por su composición constituye una buena alternativa a la soja. De este modo, el aislado proteico fue obtenido a partir de la harina de altramuz mediante la extracción alcalina y posterior precipitación de las proteínas al punto isoeléctrico (Lqari *et al.*, 2002). Frente a otros procedimientos, este método ofrece un bajo coste de reactivos, simplicidad del proceso y buenos rendimientos. Las extracciones se realizaron en presencia de sulfito sódico para evitar la oxidación de los polifenoles de la harina a quinonas, que pueden unirse irreversiblemente a las proteínas, limitando su biodisponibilidad, y dando lugar al oscurecimiento del producto, lo que limita igualmente su uso en alimentación. Como puede observarse en la Tabla 6, la riqueza proteica del aislado obtenido por este procedimiento, fue próxima al 90%. Este valor es similar al observado por otros autores, para el aislamiento de proteínas de la misma especie (Muranyi *et al.*, 2013), así como al de otras leguminosas de grano como el haba, el garbanzo o la lenteja (Alsohaimy *et al.*, 2007; Qayyum *et al.*, 2012). Como consecuencia de obtener un

aislado proteico, el resto de componentes (no proteicos) disminuyen drásticamente con respecto a la harina de partida. En primer lugar se produce una reducción significativa del contenido en fibra insoluble superior al 80% y además, puede observarse como el aislado obtenido presenta contenidos más bajos de cenizas, azúcares, polifenoles, grasa, hidratos de carbono que la harina de partida.

Por otro lado, algunas especies de altramuz diferentes a la del altramuz dulce australiano, tienen altos niveles de alcaloides que hacen que el sabor de la semilla sea desagradable y a veces tóxica. En estos casos, la producción de aislados proteicos puede solucionar este problema, ya que los alcaloides son solubles en agua y se eliminarían durante la segunda etapa de la producción del aislado. En *L. angustifolius* el contenido de alcaloides no presenta ningún riesgo para el consumidor (<0.02% alcaloides), por lo que no sería una ventaja a destacar.

Por todo esto, el aislado proteico constituye un excelente material de partida para la producción de hidrolizados proteicos.

**Tabla 6.** Composición química de la harina y el aislado proteico de altramuz.

| <b>%</b>                 | <b>Harina</b> | <b>Aislado</b> |
|--------------------------|---------------|----------------|
| <b>Proteína</b>          | 39.91±0.35    | 87.12±0.06     |
| <b>Humedad</b>           | 5.61±0.06     | 2.24±0.05      |
| <b>Ceniza</b>            | 2.58±0.14     | 0.74±0.13      |
| <b>Azúcares solubles</b> | 0.93±0.04     | 0.04±0.00      |
| <b>Polifenoles</b>       | 0.05±0.00     | 0.01±0.00      |
| <b>Fibra</b>             | 35.41±2.07    | 5.68±0.34      |
| <b>Grasa</b>             | 6.91±0.25     | 4.89±0.17      |
| <b>Otros<sup>a</sup></b> | 8.6           | 0.0            |

a: Calculado como 100-proteína-humedad-ceniza-azúcares solubles-polifenoles-fibra-grasa.

El análisis aminoacídico de la harina y el aislado de altramuz (Tabla 7) mostró que las proteínas de altramuz presentan un alto contenido en aspártico/asparagina,

glutámico/glutamina y arginina, y son deficitarias en aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, perfil típico de las leguminosas, al igual que en lisina. Por otro lado, la proteína de altramuz presenta un menor contenido en triptófano del que se observa en otras proteínas de leguminosas como en la harina de soja (Jezierny *et al.*, 2010), lo que se justifica debido a su menor contenido en albúminas (relativamente ricas en triptófano). La composición de aminoácidos en *L. angustifolius* fue estudiada anteriormente por Lqari *et al.* (2002), quien estableció que la fracción de albúminas del altramuz presentaba un perfil de aminoácidos más equilibrado en relación a los requerimientos establecidos por la FAO que la fracción de globulinas. Desafortunadamente, la relación albúminas: globulinas en esta especie es 1:9 (Muranyi *et al.*, 2013). Por otro lado, el menor contenido de triptófano del aislado con respecto a la harina puede atribuirse a la pérdida de las albúminas en el proceso de precipitación isoeléctrica, ya que permanecen solubles.

**Tabla 7.** Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de altramuz.

|                  | Harina     | Aislado    | FAO/OMS          |
|------------------|------------|------------|------------------|
| <b>Asp + Asn</b> | 11.88±0.41 | 9.46±0.27  |                  |
| <b>Glu + Gln</b> | 20.84±0.21 | 22.79±0.40 |                  |
| <b>Ser</b>       | 6.01±0.24  | 6.35±0.05  |                  |
| <b>His</b>       | 3.23±0.08  | 2.22±0.25  | 1.9              |
| <b>Gly</b>       | 3.73±0.09  | 4.41±0.17  |                  |
| <b>Thr</b>       | 3.45±0.08  | 3.94±0.19  | 3.4              |
| <b>Arg</b>       | 10.70±0.25 | 12.09±0.02 |                  |
| <b>Ala</b>       | 3.54±0.08  | 3.82±0.04  |                  |
| <b>Pro</b>       | 9.75±1.07  | 0.69±0.01  |                  |
| <b>Tyr</b>       | 3.64±0.39  | 4.30±0.39  |                  |
| <b>Val</b>       | 2.54±0.07  | 4.94±0.47  | 3.5              |
| <b>Met</b>       | 1.31±0.03  | 0.37±0.00  | 2.5 <sup>a</sup> |
| <b>Cys</b>       | 0.78±0.08  | 0.78±0.13  |                  |
| <b>Ile</b>       | 3.20±0.05  | 4.86±0.04  | 2.8              |
| <b>Leu</b>       | 6.65±0.11  | 8.76±0.03  | 6.6              |
| <b>Phe</b>       | 3.75±0.03  | 5.09±0.01  | 6.3 <sup>b</sup> |
| <b>Lys</b>       | 4.38±0.07  | 4.93±0.00  | 5.8              |
| <b>Trp</b>       | 0.59±0.02  | 0.23±0.23  | 1.1              |

a=Metionina + Cisteína.

b=Fenilalanina + Tirosina.

Los datos, expresados en porcentaje, son la media ± la desviación estándar de tres determinaciones.

#### 4.2. Obtención de hidrolizados proteicos de altramuz.

Los hidrolizados extensivos (GH > 10%), son utilizados en alimentación especializada como suplementos nutricionales y dietas médicas que, por su alta

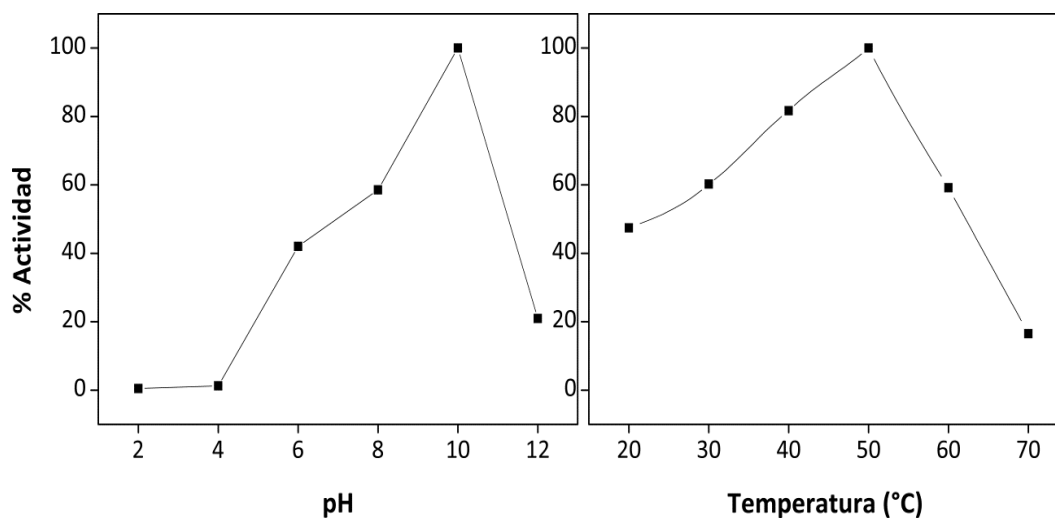
solubilidad y óptima absorción intestinal son consumidos por atletas, personas de la tercera edad o consumidores con necesidades especiales en sus dietas, así como en el tratamiento de síndromes específicos como fenilcetonuria, tirosinemia y encefalopatías hepáticas (Vioque & Millán, 2005).

En la actualidad, se emplean diversas proteasas comerciales para la elaboración de hidrolizados proteicos vegetales con actividad biológica, como Alcalase, Flavourzyme, papaína, tripsina y Pancreatina (Kong *et al.*, 2008). De hecho, en estudios recientes se han obtenido hidrolizados proteicos con actividad biológica a partir de aislados proteicos de leguminosas mediante la hidrólisis proteica con peptidasas como Alcalase 2.4 L (Yust *et al.*, 2012). Por otro lado, existen estudios que sugieren que hidrolizados proteicos del suero de leche obtenidos por hidrólisis con Alcalase muestran actividad antiinflamatoria en ratones (Carvalho-Silva *et al.*, 2012).

Para la obtención de hidrolizados proteicos a partir del aislado de altramuz se emplearon dos enzimas microbianas: Alcalase 2.4 L e Izyme AL.

#### **4.2.1. Caracterización de la enzima experimental Izyme AL.**

Mientras que Alcalase está perfectamente caracterizada (Apartado 3.2.6 de aparatos, materiales y métodos), se desconocían las condiciones óptimas de Izyme, por lo que se procedió a evaluar la actividad enzimática frente al pH y la temperatura. Como se muestra en la Figura 15 y seguidamente en la Tabla 8, Izyme mostró un pH óptimo de 10 y una T óptima de actividad de 50° C. Estas condiciones nos permiten por un lado solubilizar casi toda la proteína del aislado (pH 10), y por otro, se impide el crecimiento microbiano durante el proceso (50° C).



**Figura 15.** Actividad de Izyme frente a pH y T.

**Tabla 8.** Caracterización bioquímica de la enzima experimental Izyme.

| CARACTERÍSTICAS      | IZYME AL                                    |
|----------------------|---|
| Tipo de acción       | Actividad tripsina                          |
| Actividad enzimática | 564 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ |
| pH óptimo            | 10  |
| Temperatura óptima   | 50° C                                       |
| Inactivación         | pH 10 85° C 10 min                          |

#### 4.2.2. Obtención de los hidrolizados proteicos de altramuz.

La naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.*, 2008). Para la obtención de los hidrolizados proteicos de altramuz (HPA) con actividad antiinflamatoria se usaron dos enzimas, Izyme y Alcalase. La primera fue elegida por su actividad tipo tripsina y así poder simular al menos en parte, lo que ocurría a nivel gastrointestinal en el organismo. Por otro lado, se utilizó Alcalase por ser una proteasa ampliamente usada en la obtención de hidrolizados proteicos extensivos con actividad biológica (Ahn *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Se obtuvieron dos tipos de



hidrolizados. En primer lugar se realizó una hidrólisis secuencial utilizando Izyme durante una hora y a continuación Alcalase durante otros 60 min. El segundo tipo de hidrolizados se obtuvo únicamente con Alcalase durante una hora. En ambos casos se tomaron alícuotas a distintos tiempos y, el grado de hidrólisis fue estudiado a partir de la determinación de los grupos amino libres, como se describe en el apartado 3.3.8. de aparatos, materiales y métodos. Los HPA obtenidos usando Izyme seguido de Alcalase fueron nombrados como 0I, 15I, 30I, 60I, 60I+15A, 60I+30A, 60I+60A. Los HPA obtenidos usando Alcalase fueron designados como 0A, 5A, 10A, 15A, 20A, 25A, 30A, y 60A. El número indica el tiempo de hidrólisis en minutos. Todos estos hidrolizados fueron seleccionados para el estudio de la actividad antiinflamatoria.

El grado de hidrólisis obtenido con Izyme fue del 9 % aproximadamente (Figura 16A). Este grado de hidrólisis no se incrementó con el tiempo de hidrólisis ni con la relación enzima/sustrato. Teniendo en cuenta que el contenido de arginina y lisina del aislado es del 15%, con Izyme se consigue el 60% de la hidrólisis máxima teórica. Debido a que la mayoría de los péptidos bioactivos conocidos en la actualidad, contienen de 2 a 20 aminoácidos y tienen masas moleculares inferiores a 6000 Da (Sarmadi & Ismail, 2010), se realizó una segunda hidrólisis utilizando Alcalase durante una hora después de la hidrólisis con Izyme. De esta manera, se alcanzó un grado de hidrólisis del 30%.

La velocidad de hidrólisis del aislado proteico utilizando sólo Alcalase fue rápida durante los primeros 10 min y luego se mantuvo más o menos estable durante los 50 min restantes, alcanzando un máximo de grado de hidrólisis del 26% (Figura 16B). Esta velocidad de reacción también se ha observado para la hidrólisis de otras proteínas vegetales como la colza, el garbanzo o la jatropha, utilizando Alcalase (Chabanon *et al.*, 2007; Yust *et al.*, 2012; Marrufo-Estrada *et al.*, 2013). Por otra parte, un grado de hidrólisis mayor produce un tamaño más pequeño de los péptidos, siendo reconocido el hecho de que péptidos de bajo peso molecular, pueden ser absorbidos a nivel intestinal (Roberts *et al.*, 1999).

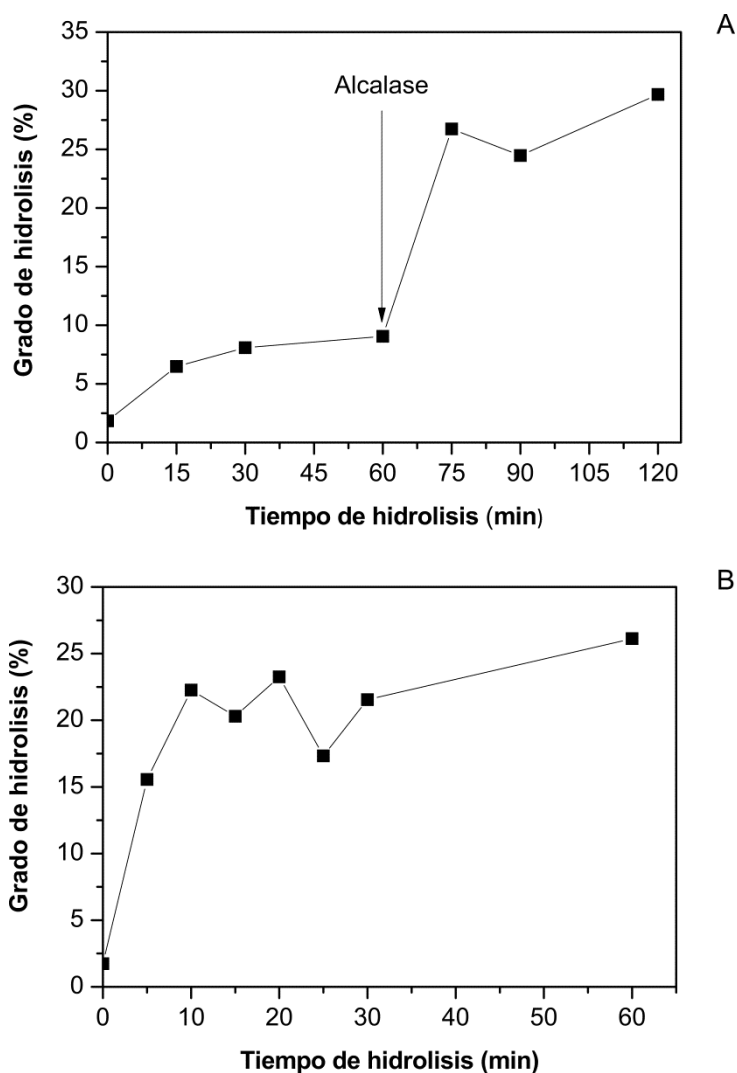


Figura 16. Hidrólisis del aislado proteico con Izyme y Alcalase (A) y Alcalase (B).

### 4.3. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos de altramuz.

#### 4.3.1. Efecto de los hidrolizados proteicos de altramuz sobre diversas enzimas implicadas en la ruta inflamatoria.

La inflamación está bajo el control de los sistemas enzimáticos plasmáticos y, de los mediadores que liberan las células que intervienen en la respuesta inflamatoria.

Los sistemas enzimáticos plasmáticos de activación en la reacción inflamatoria, son un conjunto de proteínas, coordinadas en sus funciones, que se encuentran en el plasma y funcionan de acuerdo con unas propiedades funcionales comunes. Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados, se ha estudiado *in vitro*, la influencia de los mismos sobre la actividad de diversas enzimas implicadas en la ruta inflamatoria: PLA<sub>2</sub>, COX-2, trombina, y TG.

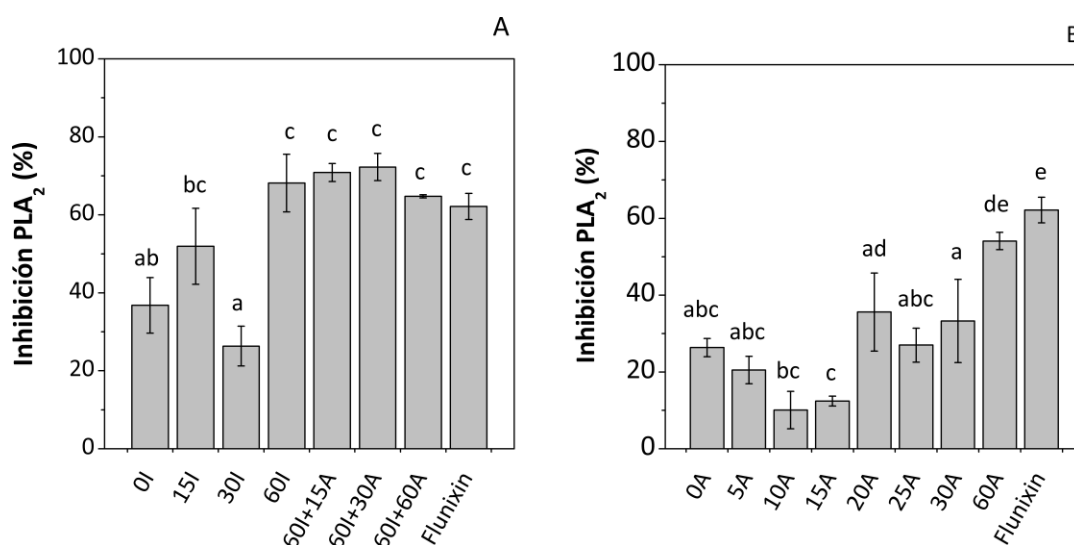
#### 4.3.1.1. Inhibición de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>.

Las PLA<sub>2</sub> son enzimas de bajo peso molecular que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos de membrana, liberando ácidos grasos insaturados y ácido araquidónico, un precursor de los eicosanoides que incluyen prostaglandinas y leucotrienos. Estas enzimas están implicadas en diversos procesos fisiológicos como el asma, la inflamación, la carcinogénesis, la hemostasis, el parto, el mantenimiento de la función renal, el dolor y la fiebre; de hecho, es posible detectarlas en el suero y fluidos biológicos de pacientes con problemas inflamatorios, autoinmunes o alergias (Triggiani *et al.*, 2006). En un estudio reciente se ha demostrado que turmerin, una proteína de *Curcuma longa* L. presenta cierta actividad antioxidante por inhibición de la peroxidación lipídica y una actividad antiinflamatoria por su capacidad para inhibir la PLA<sub>2</sub> (Chethankumar, 2010).

La capacidad de los hidrolizados proteicos de altramuz para inhibir la actividad PLA<sub>2</sub> *in vitro* fue evaluada por la medida de la fluorescencia producida tras la hidrólisis del sustrato 10-pyreno-PC que se describe en el apartado 3.3.10. de aparatos, materiales y métodos, en presencia y ausencia de dichos hidrolizados.

La hidrólisis del aislado proteico con Izyme AL durante 60 min aumentó la inhibición de la actividad PLA<sub>2</sub> en más del 68% (Figura 17A), siendo este valor similar al obtenido para el control positivo, flunixin. Tras la adición de Alcalase no se produjo un aumento o disminución significativos en la actividad de la PLA<sub>2</sub>. Esto puede ser debido a la destrucción de péptidos inhibidores de la actividad fosfolipasa y a la generación de otros nuevos durante el proceso hidrolítico, sin que de forma neta aumente o

disminuya la actividad de la misma. No obstante, la hidrólisis posterior con Alcalase produce péptidos más pequeños que pueden ser absorbidos más fácilmente en el tracto gastrointestinal, siendo más probable que estos lleguen a ejercer el efecto inhibidor *in vivo*. En cuanto a los HPA obtenidos utilizando exclusivamente Alcalase, sólo el HPA 60A mostró una mayor inhibición de la actividad que el control sin hidrólisis a tiempo cero (Figura 17B). En general, la inhibición de la actividad PLA<sub>2</sub> de los hidrolizados con Alcalase fue menor a la alcanzada con los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis secuencial con Izyme y Alcalase.



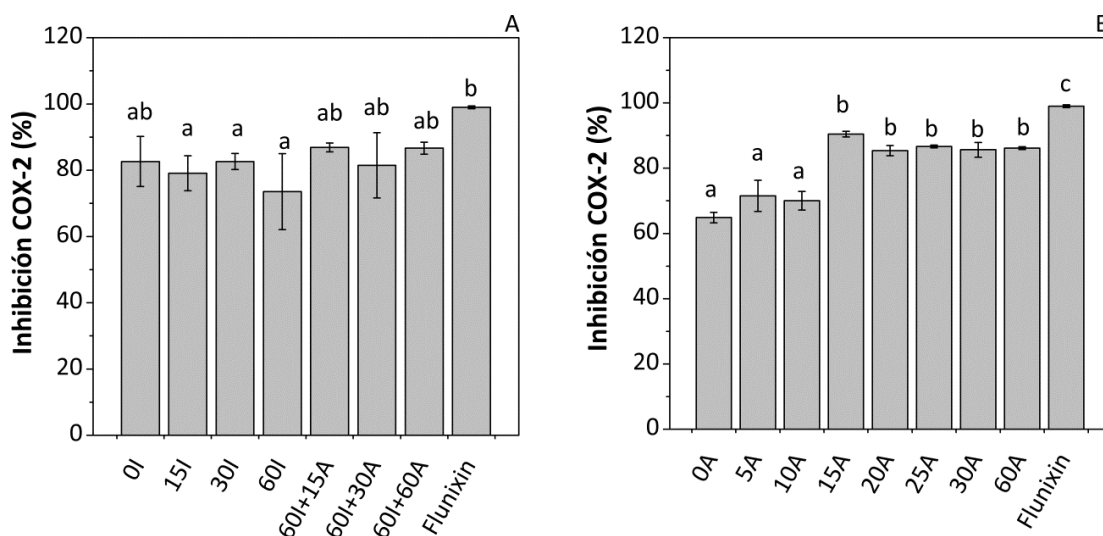
**Figura 17.** Inhibición de la actividad PLA<sub>2</sub> por los HPA obtenidos mediante la hidrólisis secuencial de Izyme AL y Alcalase (A) y los obtenidos mediante la hidrólisis con Alcalase (B).

#### 4.3.1.2. Inhibición de la actividad ciclooxigenasa-2.

La enzima reguladora de la síntesis de prostaglandinas es la COX, también denominada prostaglandina G2/H2 sintasa. Esta enzima, que está localizada en el retículo endoplásmico o en sus alrededores, cataliza la transformación de ácido araquidónico a prostaglandina G2 mediante la adición de dos moles de oxígeno molecular, y posteriormente la conversión a prostaglandina H2, que después es transformada por diversas isomerasas específicas a las diferentes prostaglandinas y tromboxanos bioactivos: PGE2, PGI2, PGF2 $\alpha$ , PGD2, o tromboxano A2 (TxA2).

(Kanterman *et al.*, 2012). Por lo tanto, la COX realiza la reacción inicial que conduce a la formación de prostaglandinas proinflamatorias, tromboxanos y prostaciclina. La COX existe en dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es considerada una enzima constitutiva, mientras que la COX-2 es una enzima inducible que se expresa en el curso de la inflamación y otros estreses celulares (Gierse *et al.*, 1999). La COX-2 media la síntesis de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), que a su vez, promueve la proliferación celular y la secreción de citoquinas y suprime la vigilancia inmune por diversos mecanismos, tales como la inhibición de la activación de los linfocitos, que inducen la respuesta inmune celular Th1, la secreción de la IL-2 y la supresión de las células dendríticas, a través de la IL-10. La vía de la COX-2 se activa en enfermedades inflamatorias, como la enfermedad de Crohn y en el carcinoma de colon (Kanterman *et al.*, 2012).

En la Figura 18 se observa que la proteína de altramuz no hidrolizada muestra un alto porcentaje de inhibición de la actividad COX-2, siendo mayor en el caso de O1 que en O0A. Estas diferencias pueden ser debidas al efecto producido por las diferencias de pH de ambas muestras (10 y 8 respectivamente), que puede provocar tanto una mayor solubilidad de las proteínas como cambios en la estructura de las mismas. La hidrólisis del aislado proteico con Izyme seguido por Alcalase no hizo mejorar su capacidad para inhibir la actividad de la COX-2, aunque en todos los casos, los HPA inhibieron en más del 70% la actividad de esta enzima (Figura 18A). En la Figura 18B puede verse que cuando el aislado proteico se hidrolizó utilizando sólo Alcalase, el incremento en el porcentaje de inhibición de la actividad COX-2 fue significativo con respecto al control después de 15 min de tratamiento, alcanzándose valores superiores al 90%. Estos datos son especialmente importantes cuando se comparan con los obtenidos con el inhibidor de referencia, flunixin, que inhibió en un 98% la actividad enzimática, cuando se usó a una concentración ligeramente menor que la de los HPA (1.24 mg/mL frente a 1.75 mg/mL). Por otra parte, los HPA están constituidos por una gran variedad de péptidos y, probablemente, sólo algunos de éstos, poseerían la capacidad de inhibir la COX-2, por lo tanto, una purificación de dichos péptidos podría resultar en sustancias con mayor actividad inhibidora (Li *et al.*, 2012).



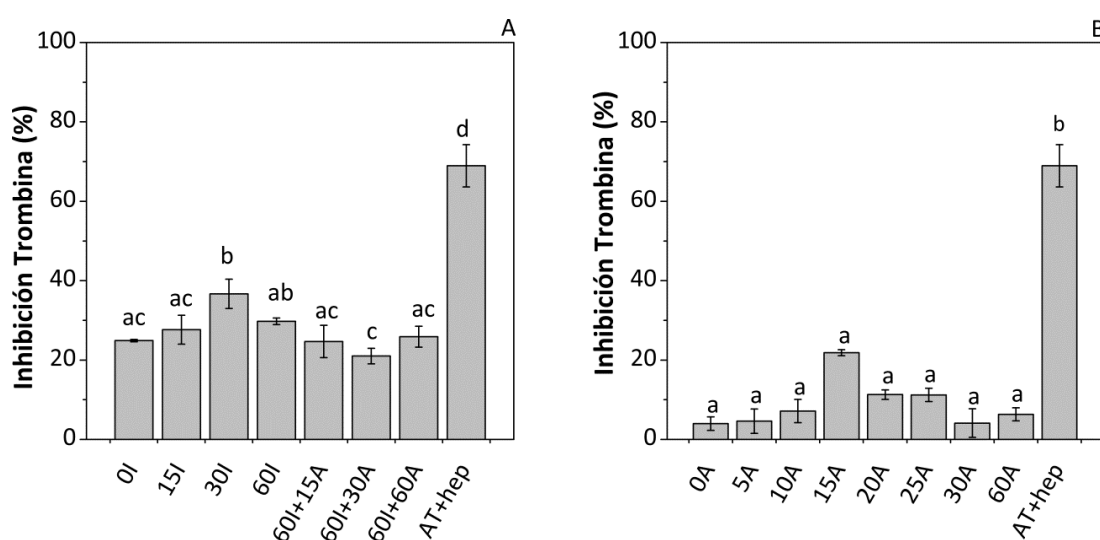
**Figura 18.** Inhibición de la actividad COX-2 por los HPA obtenidos mediante la hidrólisis secuencial de Izyme y Alcalase (A) y los obtenidos mediante la hidrólisis con Alcalase (B).

#### 4.3.1.3. Inhibición de la actividad trombina.

La trombina es una proteasa tipo serina que desempeña un papel fundamental en la hemostasis, ya que actúa en la cascada de coagulación catalizando la conversión del fibrinógeno en fibrina contribuyendo a la formación de un coágulo de sangre. Además, la trombina ejerce una serie de efectos proinflamatorios y mitógenos y se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad vascular (Morris *et al.*, 1994). Específicamente, la trombina ejerce numerosos efectos celulares, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, y la producción de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) por las células endoteliales vasculares (Strande & Phillips, 2009).

La hidrólisis de las proteínas de altramuz durante 30 min con Izyme, inhibió la actividad de la trombina en más del 36% (Figura 19A). Cuando aumentó el tiempo de hidrólisis, y por tanto el grado de hidrólisis, la actividad inhibidora de trombina de los hidrolizados obtenidos fue reducida a los valores iniciales, evidenciando que no existe una correlación entre el grado de hidrólisis y la capacidad inhibidora de los péptidos formados durante la reacción proteolítica. Por otra parte, la mayor inhibición de la

actividad trombina con los hidrolizados obtenidos sólo con Alcalase, corresponde al tiempo de hidrólisis de 15 min (Figura 19B). Estos resultados pueden ser debidos a la destrucción de los péptidos potencialmente antiinflamatorios, generados en las primeras etapas de la hidrólisis enzimática y a la producción de otros nuevos, de tal forma que la inhibición de la trombina por los HPA no depende del grado de hidrólisis sino, de la generación de péptidos específicos. Estos resultados son similares a los aportados sobre efectos hipocolesterolémicos y antioxidantes por Yust *et al.*, (2012).



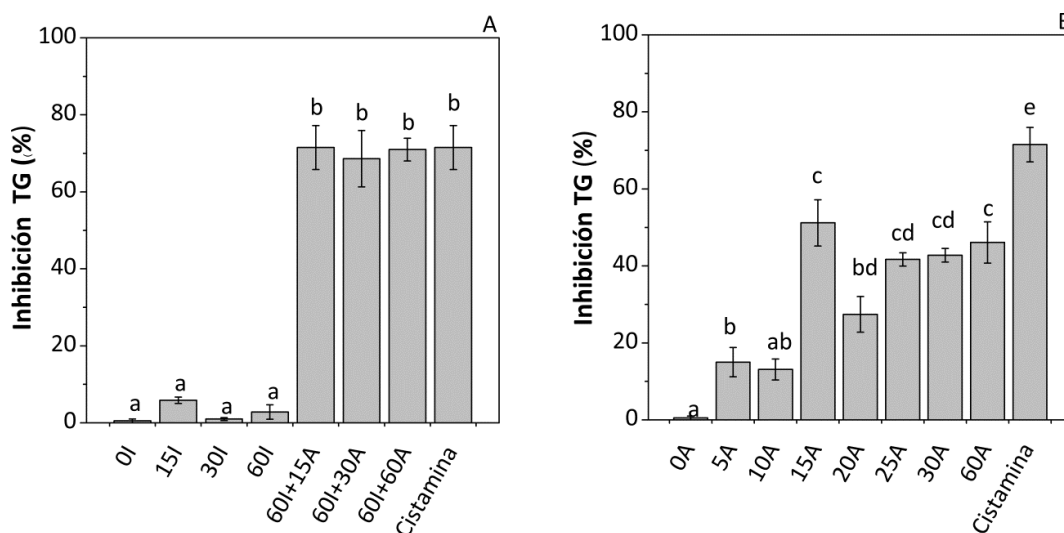
**Figura 19.** Inhibición de la actividad trombina por los HPA obtenidos mediante la hidrólisis secuencial de Izyme y Alcalase (A) y los obtenidos mediante la hidrólisis con Alcalase (B).

#### 4.3.1.4. Inhibición de la actividad transglutaminasa.

La TG es una enzima calcio-dependiente que cataliza el entrecruzamiento covalente de grupos  $\gamma$ -carboxamida de péptidos unidos a residuos de glutamina con grupos  $\epsilon$ -amino de péptidos unidos a residuos de lisina. El aumento de la expresión de esta enzima, es motivo de estudio en numerosas enfermedades inflamatorias. De esta manera, se ha sugerido la participación de TG en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas, como la cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, y la artritis reumatoide (Kumar & Mehta, 2013). Moreno (2006) ha descrito que ciertos péptidos

denominados antiinflaminas presentan efectos antiinflamatorios debidos, al menos en parte, a su capacidad para inhibir la TG.

La inhibición de la actividad TG por parte de los HPA obtenidos con Izyme y Alcalase y sólo con Alcalase se muestra en las Figuras 20A y 20B respectivamente. Los hidrolizados obtenidos tras la hidrólisis solo con Izyme tuvieron poco efecto sobre la actividad TG. Sin embargo, la adición de una segunda etapa de hidrólisis con Alcalase produjo un aumento significativo de la inhibición de la actividad enzimática, alcanzándose valores superiores al 70% (Figura 20A). Este resultado fue similar al del control positivo, cistamina (usada a una concentración 130 veces menor que la de los HPA), un neuroprotector utilizado en numerosos modelos de enfermedades, cuyo beneficio terapéutico se ha atribuido a la inhibición de la TG y la caspasa 3 (Jeitner *et al.*, 2005). Por otro lado, todos los HPA obtenidos exclusivamente con Alcalase mostraron inhibición de TG, presentando la mayor inhibición el HPA 15A, que inhibió el 51% de la actividad TG (Figura 20B).



**Figura 20.** Inhibición de la actividad TG por los HPA obtenidos mediante la hidrólisis secuencial de Izyme y Alcalase (A) y los obtenidos mediante la hidrólisis con Alcalase (B).

Considerando conjuntamente los resultados de inhibición de la actividad de las cuatro enzimas estudiadas, se concluyó que los hidrolizados que presentaron los mejores resultados eran los HPA 60I+15A y 15A.



#### 4.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos de las diferentes enzimas inflamatorias de los hidrolizados seleccionados.

A partir de los HPA 60I+15A y 15A seleccionados anteriormente, se realizaron diferentes ensayos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  mediante la ecuación de Lineweaver-Burk encaminados a establecer el tipo de inhibición enzimática.

El análisis cinético de la inhibición de la PLA<sub>2</sub> muestra unos valores de  $K_m$  de 3.5  $\mu\text{M}$  en el caso del HPA 60I+15A y de 1.36  $\mu\text{M}$  para el HPA 15A obtenidos a partir de la velocidad de la reacción ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) y de la concentración de sustrato ( $\mu\text{M}$ ) según establece la ecuación de Lineawer-Burk (Tabla 9). En ausencia de inhibidores la obtenida fue de  $K_m$  1.21  $\mu\text{M}$ . En ambos casos, la inhibición producida por los HPA parece ser del tipo competitiva ya que la  $V_{m\acute{a}x}$  se mantiene constante respecto al control sin inhibidor, y es el cociente  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  el que disminuye en el caso del HPA 60I+15A. En el caso del HPA 15A, el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática es bajo, superando apenas el 10%, por lo que se obtuvieron unos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  similares. En este caso, el ratio  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  no disminuye, pero el valor de  $K_m$  del HPA 15A es mayor que el del control, por lo que la inhibición también parece ser del tipo competitiva.

El ensayo cinético enzimático de la COX-2 presentó un valor de  $K_m$  de 5.15  $\mu\text{M}$  en ausencia de inhibidores. Cuando los HPA 60I+15A y 15A fueron añadidos al medio de reacción, los valores de  $K_m$  obtenidos alcanzaron 17.5 y 15.9  $\mu\text{M}$  respectivamente. Por otra parte, el ratio  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  disminuyó en ambos casos, indicando que los HPA no inhiben la COX-2 de forma competitiva o acompetitiva, sino mediante una inhibición mixta (no competitiva).

La  $K_m$  de la inhibición de la trombina fue de 23.2  $\mu\text{M}$  para el HPA 60I+15A y de 32.6  $\mu\text{M}$  para el HPA 15A. En este caso, ambos hidrolizados parecen inhibir competitivamente la trombina debido a que la  $V_{m\acute{a}x}$  se mantuvo constante durante el ensayo, mientras que el ratio  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  disminuyó.

Respecto a los parámetros cinéticos de la inhibición de la TG, el valor de  $K_m$  estimado para dansil-CAD en este estudio fue 12.6  $\mu\text{M}$ , similar al obtenido por Lorand *et al.* (1971), quienes obtuvieron un valor de  $K_m = 14 \mu\text{M}$  con  $\alpha$ -caseína como aceptor. Para los hidrolizados, se obtuvo una  $K_m$  de 13.4  $\mu\text{M}$  en el caso del HPA 60I+15A, y de 14.6  $\mu\text{M}$  para el HPA 15A. Por lo tanto, la inhibición parece ser de tipo mixta ya que la  $V_{\text{máx}}$  y el ratio  $V_{\text{máx}}/K_m$  disminuyeron.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de PLA<sub>2</sub>, COX-2, trombina y TG en presencia de los hidrolizados proteicos de altramuz seleccionados.

| Enzima  | PLA <sub>2</sub> |                      | COX-2            |                      | Trombina         |                      | TG               |                      |
|---------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
|         | $V_{\text{máx}}$ | $V_{\text{máx}}/K_m$ | $V_{\text{máx}}$ | $V_{\text{máx}}/K_m$ | $V_{\text{máx}}$ | $V_{\text{máx}}/K_m$ | $V_{\text{máx}}$ | $V_{\text{máx}}/K_m$ |
| Control | 1.01             | 0.83                 | 15.6             | 3.04                 | 17.9             | 1.09                 | 7288             | 578.0                |
| 60I+15A | 1.16             | 0.36                 | 11.7             | 0.67                 | 17.5             | 0.75                 | 5072             | 377.4                |
| 15A     | 0.97             | 0.71                 | 11.1             | 0.70                 | 19.3             | 0.59                 | 5871             | 403.2                |

#### 4.3.3. Efecto antiinflamatorio de los HPA en macrófagos derivados de células THP-1.

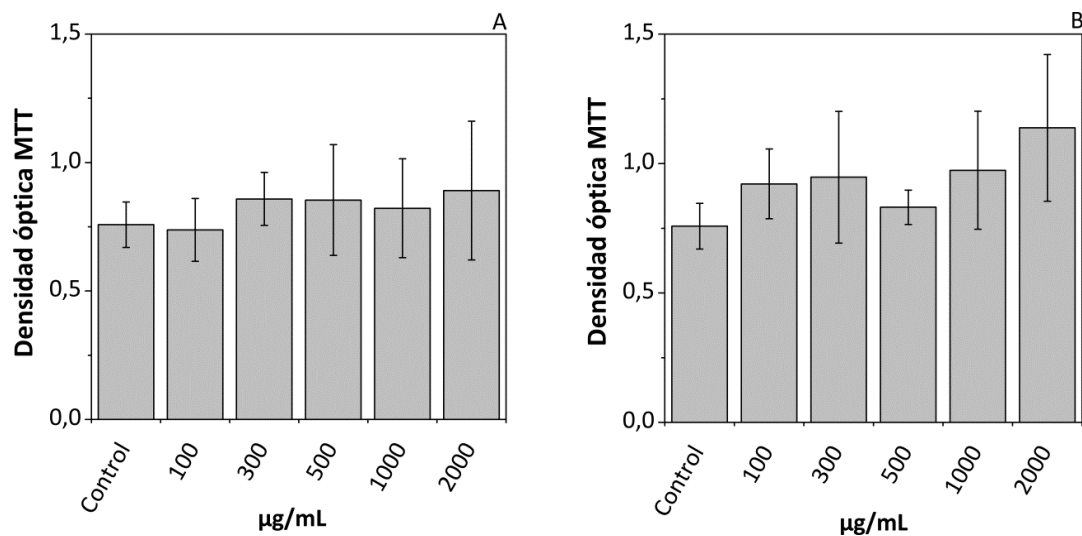
El efecto de los dos hidrolizados proteicos seleccionados anteriormente 60I+15A y 15A, se evaluó *in vitro* en un modelo de macrófagos derivados de THP-1.

##### 4.3.3.1. Efecto de los HPA sobre la integridad celular de los macrófagos derivados de THP-1.

Antes de evaluar la actividad antiinflamatoria de los HPA, se evaluó la citotoxicidad y la viabilidad celular en los macrófagos derivados de THP-1 (Gülden & Seibert, 2003). La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos en producir una alteración de las funciones celulares básicas, que origina un daño que puede ser detectado (Repetto, 2002). La evaluación de

compuestos alimenticios en cultivos celulares ha tenido un amplio desarrollo en el área de la alimentación y salud, ya que suponen un sistema efectivo para la determinación de la toxicidad de muchos compuestos. Si bien es cierto que todavía el uso de animales es aún imprescindible para algunos tipos de experimentación, en el área de las ciencias de la salud, particularmente en los efectos de toxicidad crónica, hay muchas situaciones en las que la metodología *in vitro* puede sustituir eficientemente los estudios *in vivo*. Se han realizado trabajos de validación, que han demostrado que existe una alta correlación, entre los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* (Acevedo Fernández *et al.*, 2013). Estas pruebas son relativamente simples, rápidas y de bajo costo, proporcionando una evaluación valiosa sobre las sustancias que deberían ser descartadas o sujetas a caracterización posterior. De esta manera, el aislamiento, propagación y caracterización de poblaciones celulares, se destaca como la principal metodología para iniciar la caracterización *in vitro* de compuestos bioactivos.

Por tanto, para investigar si los HPA pudieran causar un efecto citotóxico, se realizó un ensayo de proliferación celular, mediante la reducción metabólica de MTT en los macrófagos derivados de THP-1, después de añadir al medio de cultivo RPMI, diferentes concentraciones de cada uno de los dos HPA por separado, durante 24 h de tratamiento. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y, su actividad funcional, es interpretada como una medida de la viabilidad celular. Después de analizar los datos obtenidos, se comprobó que ninguno de los dos hidrolizados de estudio presentaron efectos significativos comparados con el control sin tratamiento (Figura 21A y 21B).



**Figura 21.** Efecto de los HPA (500-2000 µg/mL) 60I+15A (A) y 15A (B) sobre la proliferación celular de los macrófagos determinada por el ensayo de MTT después de 24 h de tratamiento.

El análisis del contenido de ADN se llevó a cabo mediante la captación de yoduro de propidio por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por las células irradiadas a cierta longitud de onda, se detecta y de esta manera se pueden analizar poblaciones celulares diferentes (Van Craenenbroeck *et al.*, 2013). Este ensayo es más rápido en comparación con otros métodos que utilizan 3H-timidina y ensayos de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) (Brown *et al.*, 2011).

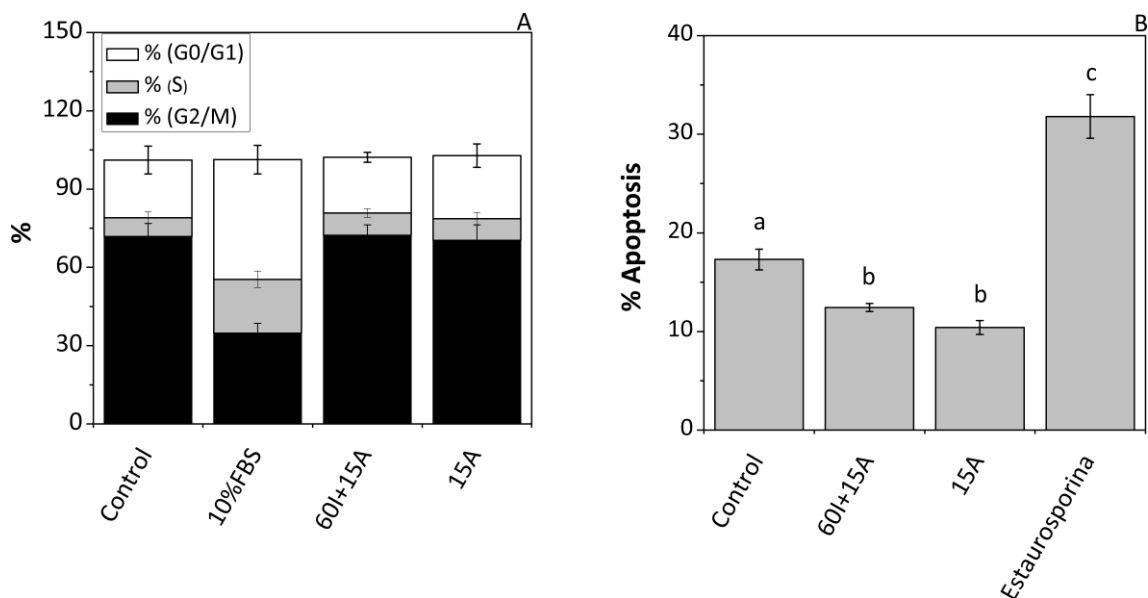


**Figura 22.** Representación esquemática de las etapas del ciclo celular.

Así, utilizando el análisis de citometría de flujo para estudiar la distribución del ADN en el ciclo celular (Sawai & Domae, 2008), se observó que el porcentaje de la población de macrófagos derivados de THP-1 tratados con los HPA 60+15A y 15A en fase S se incrementó ligeramente (Figura 23A) pero no alcanzó significación. Para la fase de reposo (G0/G1) y la población de G2/M no se encontraron diferencias significativas con el control (1% FBS). Para todas las muestras, a pesar de observarse un cierto grado de actividad proliferativa que no fue significativa, se ha comprobado que las células se mantuvieron en la fase de reposo durante un período más largo. Como control positivo se usó 10% FBS.

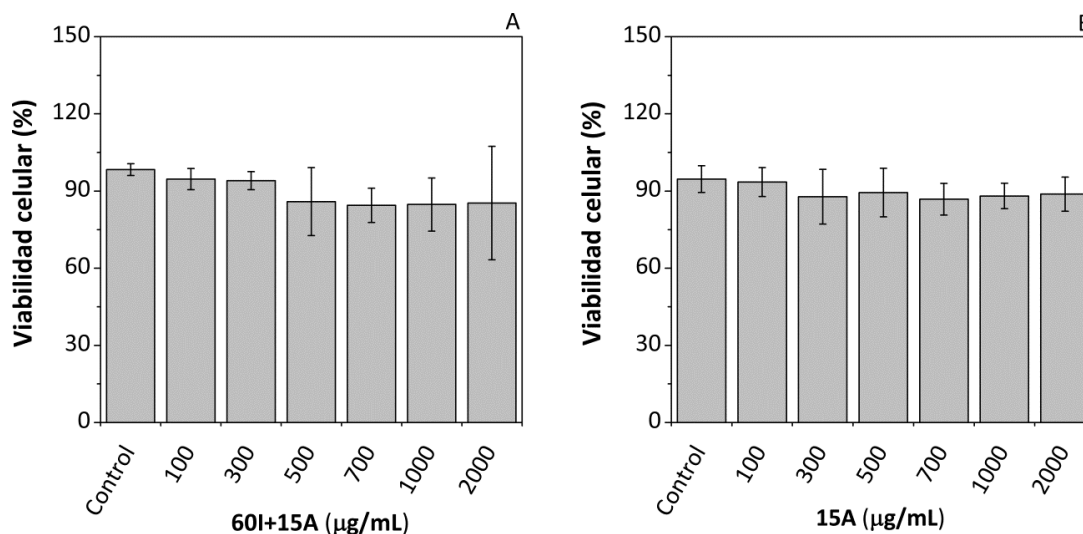
Por otro lado, se investigó la contribución de HPA a la activación de la muerte celular programada (apoptosis). Curiosamente, la apoptosis se redujo en presencia del HPA 60+15A y del 15A (29 y 35%, respectivamente) en comparación con el control (Figura 23B). Este efecto parece dotar a ambos HPA con un efecto protector contra la apoptosis. La apoptosis es una de las causas principales de la muerte de células como cardiocitos y de la progresión de la insuficiencia cardíaca (Sánchez-Más *et al.*, 2010),

por lo que esta actividad inhibidora de los hidrolizados podría tener implicaciones clínicas y terapéuticas en otras enfermedades inflamatorias.



**Figura 23.** Estudio de la distribución del ADN en el ciclo celular (% G0/G1, % S y % G2/M) en macrófagos derivados de células THP-1 tratadas con los HPA 60I+15A y 15A (A). Porcentaje de muerte celular apoptótica en macrófagos derivados de células THP-1 después del tratamiento con los HPA a 500 µg/mL durante 24 h (B). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes (<0.05).

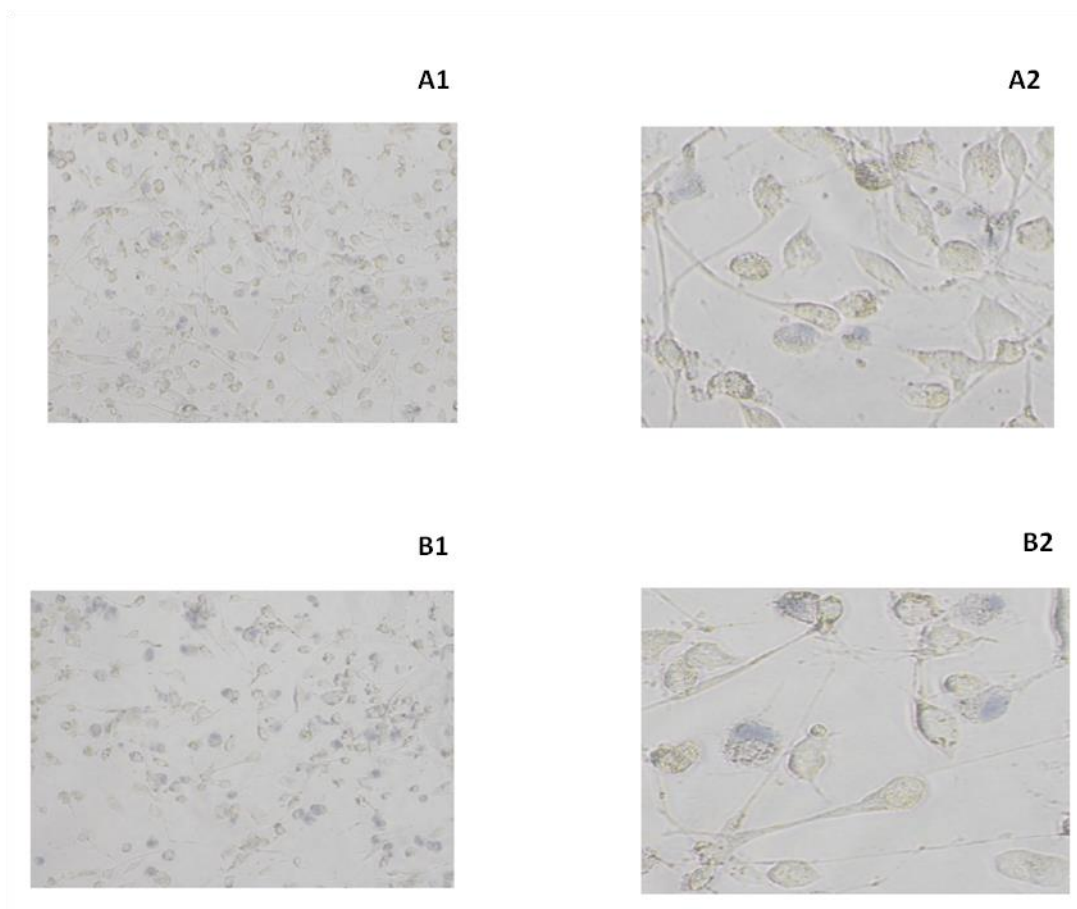
Para completar los estudios sobre el efecto de los HPA sobre la integridad celular, se determinó la viabilidad celular (número de células viables) mediante el método de exclusión con azul tripán en los macrófagos derivados de THP-1 tratados con diferentes concentraciones de los dos hidrolizados durante 24 h. Como era de esperar tras los resultados de los ensayos anteriores, no hubo diferencias en la viabilidad de las células con respecto al control después de 24 h de incubación con las diferentes concentraciones de HPA 60I+15A, que se encontraron en un rango de 100-2000 µg/mL (Figura 24A). En la Figura 24B se representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido en el caso del HPA 15A, y se observan unos resultados similares a los del hidrolizado anterior.



**Figura 24.** Efecto de los HPA 60I+15A (A) y 15A (B) en la viabilidad celular de macrófagos derivados de THP-1, determinada mediante el ensayo de exclusión con azul tripán, en presencia de los HPA 60I+15A (A) y 15A (B), después de 24 h de tratamiento y diferentes concentraciones (100-2000 µg/mL).

Estos resultados fueron corroborados mediante visualización por microscopía (Figura 25) donde se observó que la morfología de los macrófagos no se ve alterada tras la incubación con ambos hidrolizados.

El análisis del conjunto de los resultados anteriores sugiere que, en general, los HPA no comprometen la integridad de los macrófagos derivados de células THP-1. Aunque la viabilidad celular se redujo después de la exposición a altas concentraciones de los hidrolizados, dicha disminución no superó el 30% en ninguno de los casos. Por lo tanto, HPA no parecen ejercer ningún efecto importante sobre la integridad de la membrana en este modelo celular. El efecto de las semillas de otras leguminosas como la soja verde han mostrado actividad antiproliferativa (Tang *et al.*, 2014).



**Figura 25.** Imágenes sobre la viabilidad celular obtenidas por microscopía en presencia de los hidrolizados 60I+15A (Figuras A1 y A2) y 15A (Figuras B1 y B2).

#### 4.3.3.2. Efecto de los HPA sobre la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias.

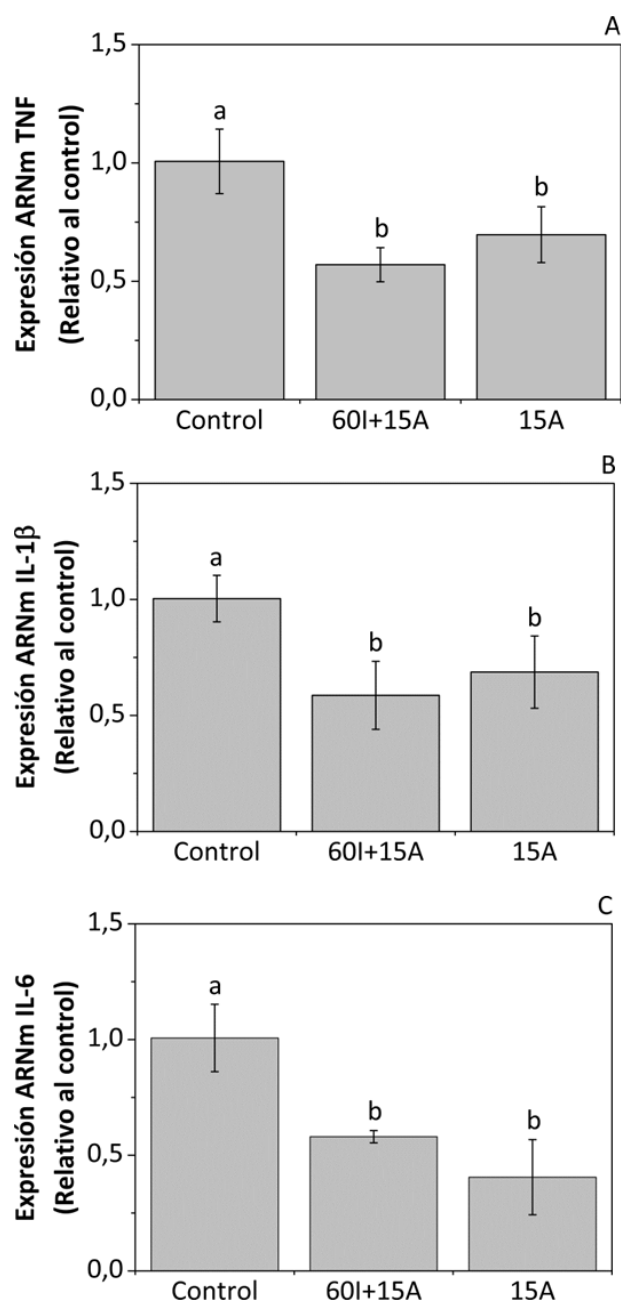
Existen diferentes enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad, artritis, enfermedades neurológicas, cardiovasculares, pulmonares y autoinmunes (Sung *et al.*, 2012) que están asociadas con una inflamación crónica subclínica. Durante las enfermedades inflamatorias, se observan unos niveles elevados de citoquinas tales como la leptina, TNF, IL-1, e IL-6 (Hajer *et al.*, 2008). En los últimos años, diversos estudios han demostrado que hidrolizados proteicos de soja, podrían prevenir muchos trastornos inflamatorios, debido a los efectos antioxidantes y antiinflamatorios que estos poseen (Politis *et al.*, 2012; Vernaza *et al.*, 2012). Los macrófagos activados



clásicamente (con un fenotipo M1) tienen la capacidad de participar en el daño tisular e iniciar respuestas inflamatorias liberando mediadores proinflamatorios (Olefsky & Glass, 2010). Estos mediadores reclutan macrófagos adicionales y propagan el estado inflamatorio crónico (Shen *et al.*, 2011).

En este sentido, lo primero que se evaluó fue la capacidad de los HPA (60I+15A y 15A) para modular la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF, IL-1 $\beta$ , e IL-6 en macrófagos derivados de THP-1 (Figura 26A-C).

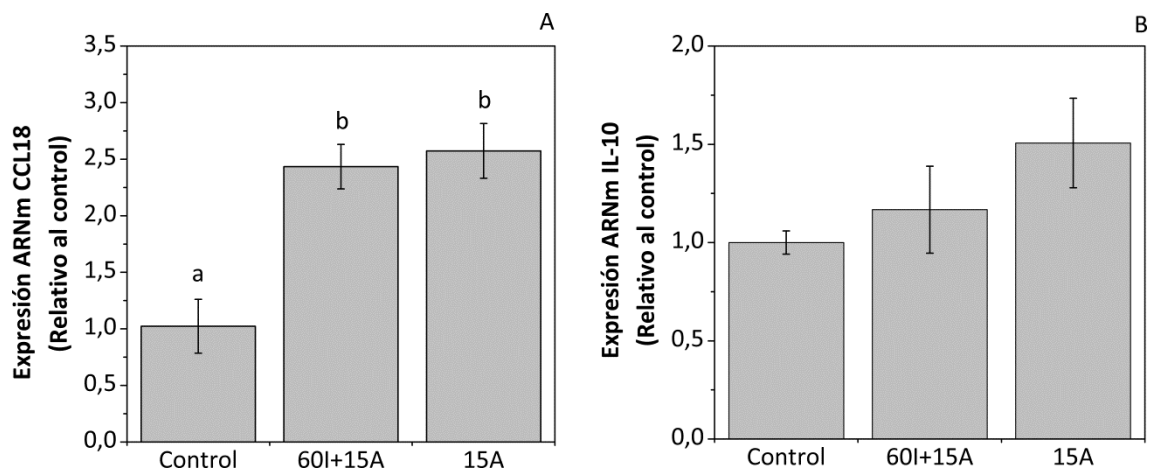
La expresión de los genes de las citoquinas estudiadas fue reducida significativamente después de 6 h de incubación con cada uno de los hidrolizados. Esta reducción fue muy pronunciada y homogénea después del tratamiento con el hidrolizado 60I+15A (TNF: -45%, la IL-1 $\beta$ : -32%, y la IL-6: -43%). Por otro lado, el HPA 15A reprimió la expresión de TNF e IL-1 $\beta$  en los macrófagos activados en un 30% y 35% respectivamente, mientras que los niveles de ARNm de la IL-6 se redujeron de forma contundente (70%). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados indican que los HPA tienden a disminuir la capacidad proinflamatoria de los macrófagos M1 activados con PMA por la reducción de la expresión de genes de citoquinas, estableciendo una tendencia de la regulación del proceso inflamatorio. La polarización del macrófago altera de forma drástica las propiedades inmunológicas de estas células, como se evidencia en las potentes propiedades antimicrobianas de los macrófagos M1, en comparación con las habilidades antiinflamatorias reparadoras de tejidos de los macrófagos M2 (Joshi *et al.*, 2010). El fenotipo de los macrófagos M2 se caracteriza por la expresión de ARNm de proteínas de superficie celular tales como CD206 y CD163 y de factores solubles, tales como CCL18 (Bellón *et al.*, 2011). De hecho, se ha demostrado la producción excesiva de CCL18 en macrófagos M2 durante varias enfermedades crónicas y fibróticas, incluyendo la enfermedad de Gaucher y la artritis reumatoide (Schutyser *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2009).



**Figura 26.** Expresión del ARNm de TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), e IL-6 (C) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con los HPA (60I+15A y 15A). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Para corroborar la hipótesis de que los HPA pueden presentar un potencial papel antiinflamatorio, se evaluó la expresión de CCL18 y IL-10 (marcadores M2) después de 6 h de incubación con los HPA 60I+15A y 15A. Sorprendentemente, ambos

hidrolizados indujeron la expresión de CCL18, duplicando su valor en comparación con el control (Figura 27A). Sin embargo, aunque se observó una tendencia a aumentar la expresión de la IL-10, no se observaron diferencias significativas con respecto al control, en los macrófagos derivados de THP-1 después del tratamiento con los HPA (Figura 27B).



**Figura 27.** Expresión del ARNm de CCL18 (A) e IL-10 (B) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con los HPA (60I+15A y 15A). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

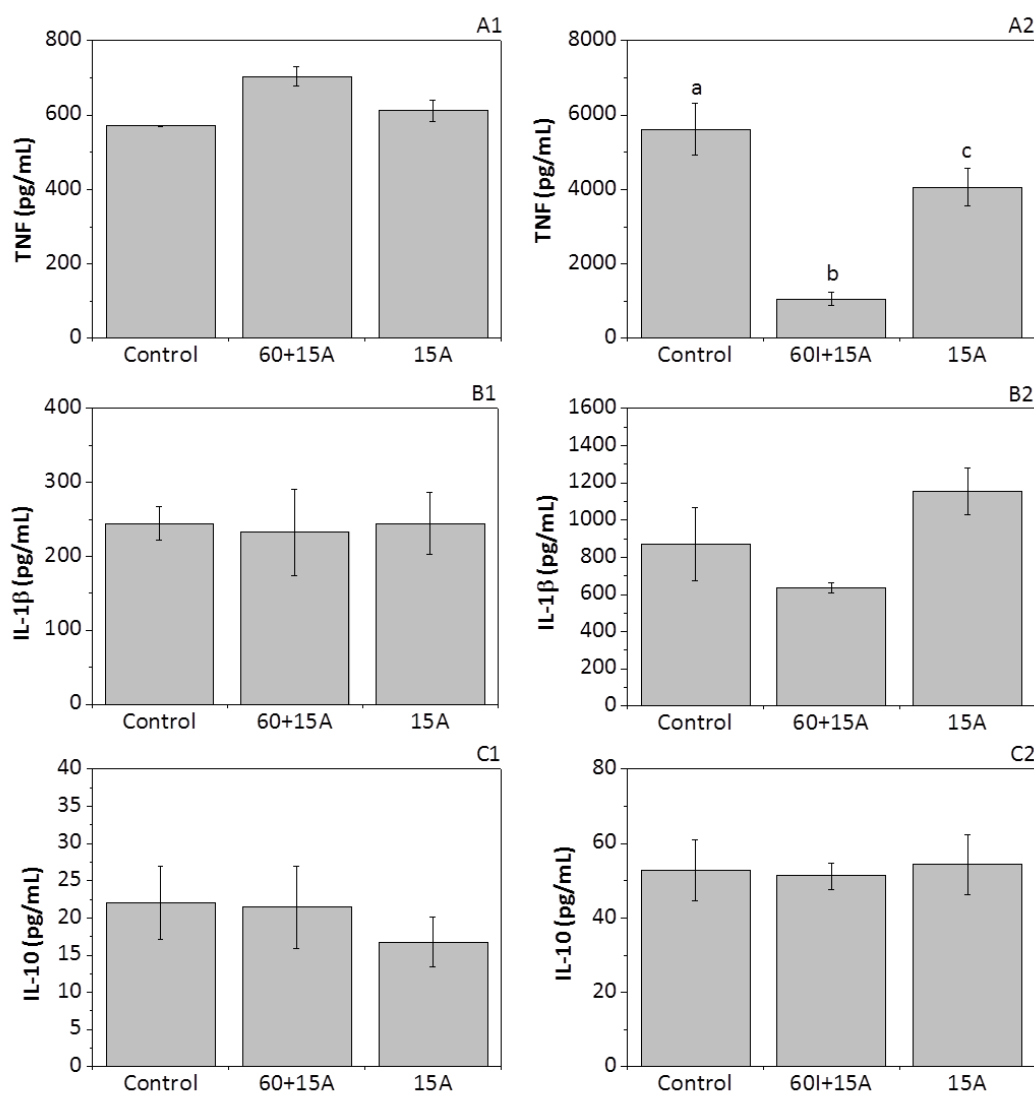
Analizados en conjunto, estos datos sugieren que los HPA 60I+15A y 15A pueden tener un efecto beneficioso sobre la capacidad para sesgar los macrófagos activados M1 hacia el fenotipo antiinflamatorio M2.

#### 4.3.3.3. Efecto de los HPA sobre la producción de citoquinas.

Algunos hidrolizados proteicos vegetales como el hidrolizado proteico de guisante, han demostrado su implicación como parte de una terapia alternativa, para la prevención de enfermedades relacionados con la inflamación, por su capacidad para inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias, entre otras (Ndiaye *et al.*, 2012). Para demostrar el efecto antiinflamatorio de los HPA se determinó la concentración de

TNF, IL-1 $\beta$  e IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos celulares después de los tratamientos a distintas horas mediante ELISA. A 6 h no se observaron diferencias significativas con respecto al control de los niveles de ninguna de las citoquinas (Figura 28A1, 28B1, y 28C1) a pesar de observarse represión de alguna de ellas (TNF e IL-1 $\beta$ ) por PCR cuantitativa (Figura 26). Esto puede ser debido a que las citoquinas presentan tasas de renovación bajas, por lo que los efectos de los tratamientos sobre la represión génica observados a 6 h por PCR cuantitativa se traducirían en los niveles de proteínas a más largo plazo. Por este motivo, los niveles de proteínas fueron evaluados también a 48 h. Durante este tiempo, la producción de TNF fue disminuida por ambos HPA (Figura 28A2). Esta inhibición de la producción fue mayor para el hidrolizado 60I+15A donde alcanzó valores superiores al 80%. Con respecto a la IL-1 $\beta$  y la IL-10, no se observaron diferencias significativas entre los HPA y el control (Figura 28B2 y 28C2, respectivamente). Este último dato coincide con el obtenido por PCR cuantitativa, donde los macrófagos derivados de THP-1 reprimieron la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF y no mostraron diferencias significativas en la expresión de la IL-10. Sin embargo no es así para la IL-1 $\beta$ , donde a pesar de que se observa una reducción del nivel de expresión génica después del tratamiento con ambos hidrolizados, sólo el hidrolizado 60I+15A parece disminuir la secreción de la proteína y no de forma significativa con respecto al control. Algunos autores exponen una cascada de citoquinas en el proceso inflamatorio, donde IL-1 $\beta$  responde a la liberación de TNF, es decir que la represión génica de TNF por PCR sí que se traduce a niveles de ELISA pero la de IL-1 $\beta$ , no ha dado aún tiempo de visualizarse. De hecho, en el hidrolizado 60I+15A se intuye más claramente que hay una disminución de IL-1 $\beta$  por ELISA, porque hay una reducción mayor a nivel de PCR y ELISA de TNF. Esto puede deberse también a una tasa de degradación lenta de la proteína, ya que la cantidad de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante depende, tanto de la tasa de síntesis como de la tasa de degradación. Muchas proteínas que son degradadas rápidamente actúan como moléculas reguladoras, como por ejemplo los factores de transcripción. En este caso es necesario el rápido reciclaje de estas proteínas para que sus niveles se ajusten rápidamente en respuesta a los estímulos externos. Otras proteínas se degradan, en respuesta a

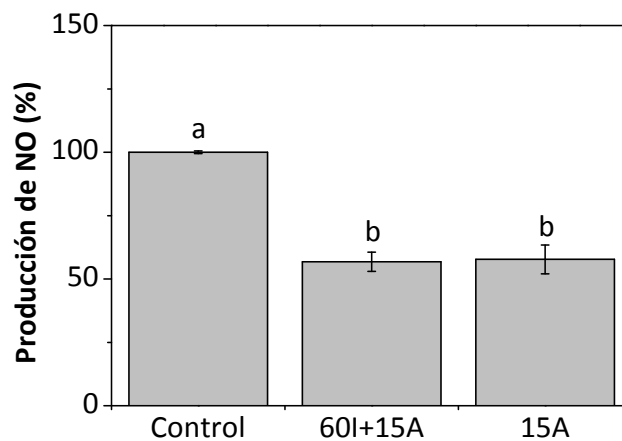
señales específicas, siendo otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática celular. La vida media de las proteínas celulares es muy variable, desde pocos minutos a varios días, y las diferencias en la tasa de degradación es un aspecto importante en la regulación celular.



**Figura 28.** Efecto sobre la producción de TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), e IL-10 (C) de los macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h (1) y 48 h (2) de tratamiento con los HPA 60I+15A y 15A. Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.3.3.4. Efecto de los HPA sobre la producción de óxido nítrico.

El NO se sintetiza a partir del aminoácido arginina mediante la enzima NO sintetasa. Una vez sintetizado, el NO difunde fuera de la célula y puede actuar localmente afectando a células próximas. Se ha demostrado que el NO desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria y la actividad inmune, y los macrófagos parecen ser la principal fuente celular de NO (Montserrat-de la Paz *et al.*, 2012). El efecto de los HPA sobre la liberación de este mediador inflamatorio se representa en la Figura 29. Ambos HPA inhibieron aproximadamente el 50% de la producción de NO. Existen estudios que avalan que hidrolizados proteicos de alimentos comerciales como la leche de soja, pueden ser usados como potenciales productos antiinflamatorios, por su capacidad de inhibición de mediadores inflamatorios como el NO (Vernaza *et al.*, 2012).

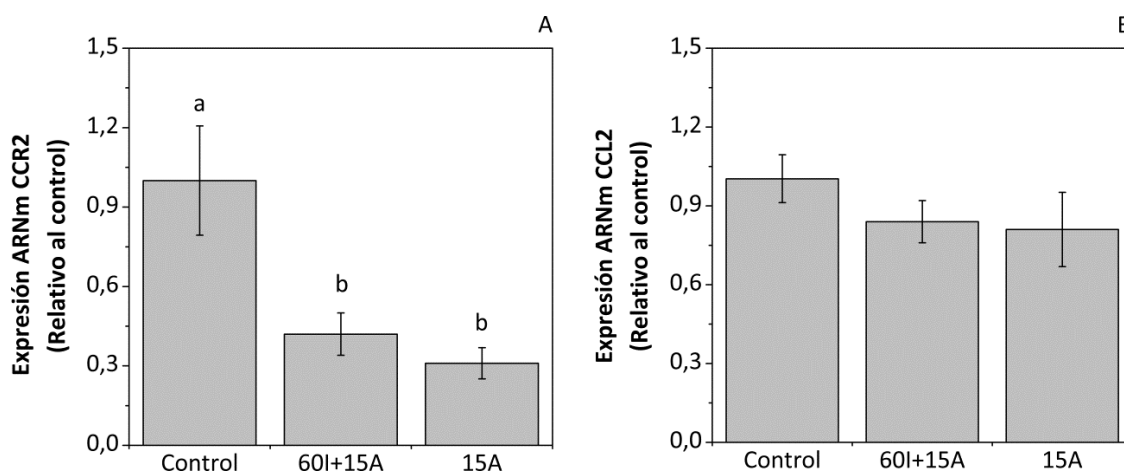


**Figura 29.** Porcentaje de producción de NO en el sobrenadante de los macrófagos derivados de THP-1 después de 48 h de tratamiento con los HPA (60I+15A y 15A). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.3.3.5. Efecto de los HPA sobre la capacidad quimiotáctica de los macrófagos derivados de THP-1 humanos.

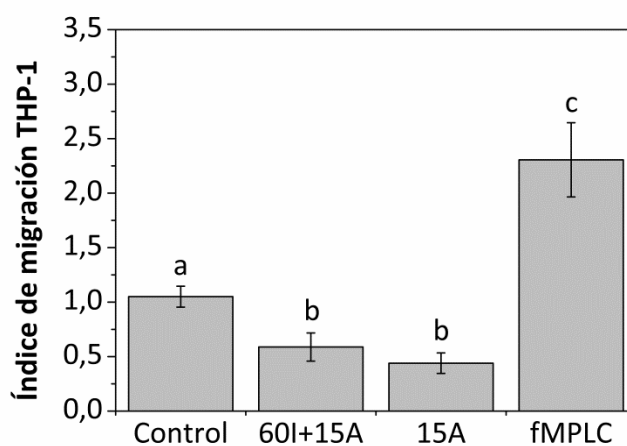
En estudios previos, Fontanari *et al.*, (2012) investigaron el potencial efecto hipolipemiante de un extracto de proteínas de *L. albus*. Este efecto parece estar asociado con un mecanismo compartido con las proteínas de soja (Lovati *et al.*, 1998; Lovati *et al.*, 2000; Duranti *et al.*, 2004). Por otro lado, las dietas a base de soja han demostrado contribuir a la reducción de las lesiones ateroscleróticas, a través de la represión de la expresión génica de quimiocinas esenciales de monocitos, para los sucesos iniciadores en la aterosclerosis, tales como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) ó CCL2 o su receptor CCR2. El CCL2 tiene un papel sistémico en la regulación del metabolismo y, en particular, en el control de la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos inflamados. Por ejemplo, Weisberg *et al.*, (2006) observaron una reducción significativa en el contenido de macrófagos en la placa aterosclerótica en ratones deficientes para CCR2 (ratones CCR2<sup>-/-</sup>). Además, existen evidencias de que en el tejido adiposo de ratones obesos se observa un aumento de los macrófagos M1 y una disminución de los M2. Sin embargo este cambio en las subpoblaciones de macrófagos, no se observaron en ratones CCR2<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que la vía MCP-1/CCR2 podría contribuir a la polarización a macrófagos M2.

Como ocurre con las proteínas de soja, los hidrolizados de altramuz podrían ejercer un efecto beneficioso en el mecanismo de la quimiotaxis, por la modulación de la vía CCR2/CCL2. Para examinar esta cuestión, se evaluó la expresión de CCR2 y CCL2 en macrófagos derivados de THP-1, después de 6 h de incubación con ambos HPA. A la vista de los resultados, la vía CCR2/CCL2 fue notablemente modulada por ambos hidrolizados (60I+15A y 15A) (Figura 30). La Figura 30A muestra una drástica reducción de la expresión de CCR2 por el HPA 60I+15A (-62%), siendo mayor la represión de la expresión del gen para el HPA 15A (-84%). A pesar de la reducción significativa de CCR2, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de su ligando, CCL2 (Figura 30B), aunque se observó una tendencia decreciente.



**Figura 30.** Expresión del ARNm de CCR2 (A) y CCL2 (B) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con los HPA (60I+15A y 15A). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Por otra parte, el índice de migración cuantificado como el porcentaje de células desplazadas desde el borde de la herida al centro de la herida (Smita *et al.*, 2002), se redujo después de 24 h de tratamiento con el HPA 60I+15A (-44%) y el HPA 15A (-58%). Como control positivo se utilizó fMPLC, un potente agente quimiotáctico (Figura 31).



**Figura 31.** Índice de migración de los macrófagos derivados de células THP-1 después de 24 h de incubación con los HPA (60I+15A y 15A) y con fMPLC. Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).



Hasta ahora, los resultados indican que la adición de los HPA a macrófagos derivados de THP-1 aunque no reprimen la expresión de CCL2, sí reducen significativamente la expresión de CCR2, y provocan una disminución de la capacidad de migración de las células. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento de macrófagos derivados de THP-1 con los HPA puede hacerles perder su capacidad quimiotáctica, lo que contribuiría a una mejora del estado inflamatorio.

#### 4.3.4. Caracterización de los HPA seleccionados.

Después de analizar los parámetros cinéticos de los HPA 60I+15A y 15A, ambos fueron caracterizados químicamente y se determinó la composición aminoacídica para cada uno de ellos.

**Tabla 10.** Composición química de los HPA seleccionados.

| %                        | Aislado    | HPA 60I+15A | HPA 15A    |
|--------------------------|------------|-------------|------------|
| <b>Proteínas</b>         | 87.12±0.06 | 70.19±0.80  | 77.03±0.09 |
| <b>Humedad</b>           | 2.24±0.05  | 7.27±0.15   | 7.97±0.19  |
| <b>Cenizas</b>           | 0.74±0.13  | 9.93±0.08   | 8.26±0.09  |
| <b>Fibra</b>             | 5.68±0.34  | n.d.        | 4.78±0.14  |
| <b>Grasa</b>             | 4.89±0.17  | n.d.        | n.d.       |
| <b>Azúcares solubles</b> | 0.04±0.002 | 0.02±0.001  | 0.02±0.001 |
| <b>Polifenoles</b>       | 0.01±0.003 | 0.05±0.001  | 0.06±0.002 |
| <b>Otros<sup>a</sup></b> | 0.0        | 12.54       | 1.88       |

n.d.: no detectado

a: Calculado como 100-proteína-humedad-ceniza-azúcares solubles-polifenoles-fibra-grasa.

La riqueza proteica de ambos HPA (70.19 y 77.03%, respectivamente) es bastante inferior a la del aislado proteico, que está próxima al 90%. (Tabla 10). Esto es debido a la alta concentración de cenizas provenientes de las NaOH añadidas durante la solubilización de las proteínas y para el mantenimiento del pH óptimo durante las

hidrólisis enzimáticas. De hecho, este porcentaje es ligeramente superior para el HPA 60I+15A debido posiblemente a un mayor consumo de NaOH en esta hidrólisis para alcanzar el pH 10 óptimo para Izyme (8 para Alcalase). Sin embargo, es este contenido en cenizas, lo que le confiere a los productos con un alto grado de hidrólisis final, un soporte adecuado que evita la caramelización del mismo en el proceso de liofilización o atomización.

La Tabla 11 muestra la composición aminoacídica del aislado proteico y los dos hidrolizados elegidos. En líneas generales, no se observan diferencias entre el aislado y los HPA. Sólo se observan contenidos ligeramente superiores en los hidrolizados con respecto al aislado en los aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico y sus amidas) y en los aminoácidos prolina y triptófano. Tanto el aislado como los HPA cumplen con las recomendaciones de la FAO para los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina, y valina. Para este último el hidrolizado 60I+15A contiene más del doble de la cantidad de referencia. El contenido en treonina (> 3.4) tiene una importancia nutricional ya que, se ha sugerido, que después de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), ocupa el segundo puesto en la lista de los aminoácidos limitantes, probablemente además de su importancia para la deposición proteica, por su papel en otras funciones fisiológicas tales como la digestión y la inmunidad (Peng *et al.*, 2007). El contenido en histidina en el aislado y los HPA también supera al recomendado (> 1.9). En cuanto al porcentaje de aminoácidos azufrados, triptófano y lisina se observan concentraciones inferiores a los límites marcados por la FAO, sin embargo, su ingesta supone un aporte a la dieta de un alto porcentaje, con valores próximos al 90% como en el caso de la lisina.

**Tabla 11.** Composición aminoacídica de los HPA seleccionados.

|                 | <b>Aislado</b> | <b>HPA 60I+15A</b> | <b>HPA 15A</b> | <b>FAO/OMS</b>   |
|-----------------|----------------|--------------------|----------------|------------------|
| <b>Asp+ Asn</b> | 9.46±0.27      | 10.26±0.58         | 10.27±0.12     |                  |
| <b>Glu+Gln</b>  | 22.79±0.40     | 22.49±0.19         | 24.47±0.17     |                  |
| <b>Ser</b>      | 6.35±0.05      | 6.32±0.23          | 5.97±0.16      |                  |
| <b>His</b>      | 2.22±0.25      | 2.16±0.06          | 2.36±0.01      | 1.9              |
| <b>Gly</b>      | 4.41±0.17      | 4.44±0.14          | 4.52±0.06      |                  |
| <b>Thr</b>      | 3.94±0.19      | 3.93±0.13          | 4.05±0.02      | 3.4              |
| <b>Arg</b>      | 12.09±0.02     | 11.43±0.36         | 11.60±0.06     |                  |
| <b>Ala</b>      | 3.82±0.04      | 3.71±0.02          | 3.89±0.07      |                  |
| <b>Pro</b>      | 0.69±0.01      | 0.85±0.03          | 0.75±0.01      |                  |
| <b>Tyr</b>      | 4.30±0.39      | 4.30±0.21          | 4.42±0.12      |                  |
| <b>Val</b>      | 4.94±0.47      | 7.23±0.07          | 3.47±0.07      | 3.5              |
| <b>Met</b>      | 0.37±0.00      | 0.28±0.00          | 0.44±0.15      | 2.5 <sup>a</sup> |
| <b>Cys</b>      | 0.78±0.13      | 0.60±0.01          | 0.56±0.19      |                  |
| <b>Ile</b>      | 4.86±0.04      | 4.36±0.07          | 4.45±0.01      | 2.8              |
| <b>Leu</b>      | 8.76±0.03      | 8.11±0.15          | 8.55±0.05      | 6.6              |
| <b>Phe</b>      | 5.09±0.01      | 4.65±0.15          | 4.95±0.01      | 6.3 <sup>b</sup> |
| <b>Lys</b>      | 4.93±0.00      | 4.52±0.08          | 4.92±0.02      | 5.8              |
| <b>Trp</b>      | 0.23±0.23      | 0.37±0.01          | 0.35±0.02      | 1.1              |

a=Metionina + Cisteína.

b=Fenilalanina + Tirosina.

Los datos, expresados en porcentaje, son la media ± la desviación estándar de tres determinaciones.

Tanto el HPA 60I+60A como el 15A presentan una composición similar en sus aminoácidos, por lo que es posible que la principal diferencia en sus actividades sea debida a la secuencia de los péptidos liberados ya que son obtenidos con diferentes enzimas y a tiempos distintos de hidrólisis.

#### **4.4. Purificación de péptidos con actividad antiinflamatoria.**

Después de analizar todos los datos correspondientes a los ensayos en células con los dos hidrolizados anteriores y comprobar que ambos presentan una potencial actividad antiinflamatoria similar en los macrófagos derivados de THP-1, se decidió seleccionar para la purificación de péptidos antiinflamatorios, el hidrolizado obtenido tras 15 min de hidrólisis con Alcalase, ya que, además de presentar una riqueza proteica superior al obtenido con Izyme y Alcalase (77.03 frente al 70.19% del 60I+15A), se obtiene a un menor tiempo de hidrólisis y con una sóla enzima, por lo que el coste económico global del proceso es menor.

##### **4.4.1. Purificación de los péptidos por ultrafiltración.**

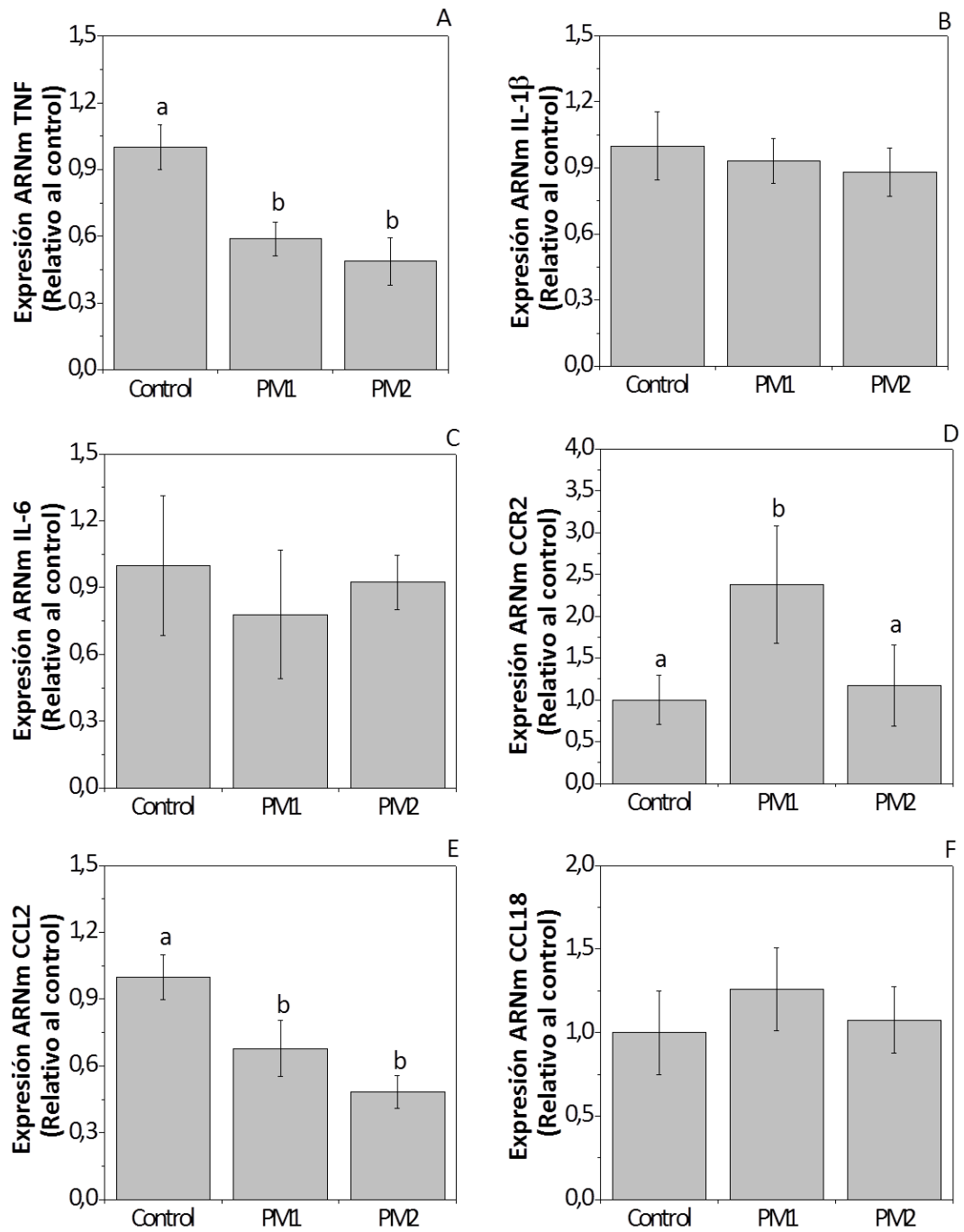
El HPA 15A se usó como materia prima para la purificación de péptidos antiinflamatorios por ultrafiltración con una membrana con corte de peso molecular de 10 kDa. Los procesos de ultrafiltración se han utilizado para purificar péptidos bioactivos a partir de hidrolizados de proteínas (Majumder & Wu, 2011; Vo *et al.*, 2013). El rendimiento en peso (%) fue evaluado en las dos fracciones obtenidas por ultrafiltración. Al retenido, con un peso molecular superior a 10 kDa se le asignó el nombre de PM1 y al permeado, con un peso molecular inferior a 10 kDa se nombró como PM2. La Tabla 12 muestra que es el permeado de ultrafiltración la fracción mayoritaria, alcanzando un porcentaje superior al 80%, al igual que su contenido proteico. Este resultado era de esperar ya que tras la hidrólisis con Alcalase durante 15 min se alcanza, como se ha descrito anteriormente, un grado de hidrólisis elevado (próximo al 20%), generándose de esta manera, péptidos de pequeño tamaño.

**Tabla 12.** Valores de rendimiento en peso y riqueza proteica de las fracciones del HPA obtenidas por ultrafiltración.

|            | Rendimiento en peso (%) | Riqueza proteica (%) |
|------------|-------------------------|----------------------|
| <b>PM1</b> | 15.72                   | 69.77                |
| <b>PM2</b> | 84.28                   | 81.96                |

La potencial actividad antiinflamatoria de ambas fracciones se determinó midiendo la expresión de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCR2, CCL2 (citoquinas proinflamatorias) y CCL18 (citoquina antiinflamatoria) en macrófagos derivados de THP-1 mediante PCR cuantitativa, con respecto al control sin tratamiento. La expresión de TNF (Figura 32A) y CCL2 (Figura 32E) se redujo significativamente por las dos fracciones obtenidas por ultrafiltración, mientras que la expresión del resto de las citoquinas proinflamatorias fue también reprimida (excepto para CCR2), aunque no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, fue evaluada la expresión de CCL18. Ambas fracciones parecen inducir la expresión de CCL18 pero este aumento no fue significativo.

Estos resultados, junto con el mayor rendimiento en peso y contenido proteico de la fracción menor de 10 kDa (84.28% y 81.96%, respectivamente), y el hecho de que los péptidos con una masa molecular relativamente baja muestran una mayor absorción intestinal y biodisponibilidad, pudiendo mantener su bioactividad hasta los objetivos específicos (Roberts *et al.*, 1999), nos llevaron a elegir la fracción PM2 para la siguiente etapa de purificación.



**Figura 32.** Expresión del ARNm de TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), CCR2 (D), CCL2 (E), y CCL18 (F) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con PM1 (>10 kDa) y PM2 (<10 kDa). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4.2. Purificación de PM2 por cromatografía de fase reversa.

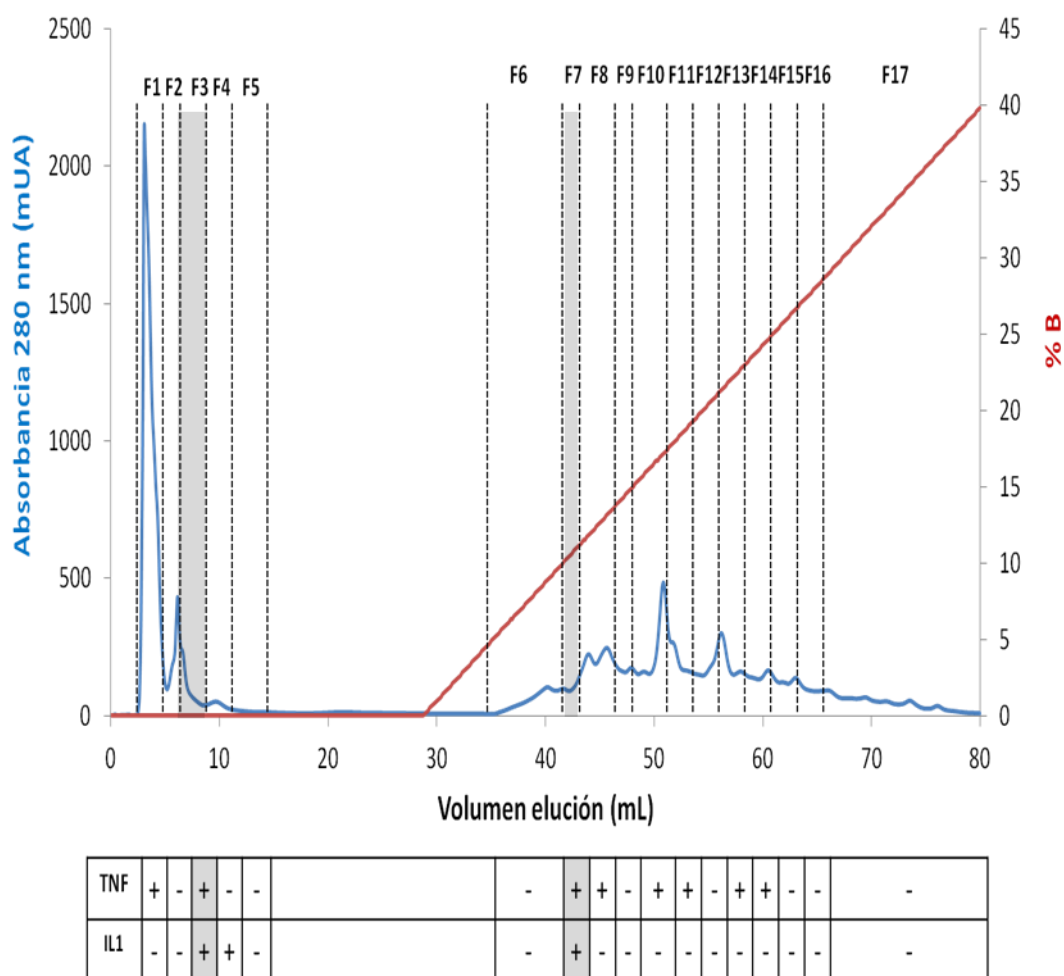
La fracción menor de 10kDa obtenida por ultrafiltración (PM2) se utilizó para la purificación de péptidos antiinflamatorios por cromatografía de fase reversa empleando una columna RPC 3 mL. La elución se realizó mediante un gradiente lineal de 0% a 100% B en 30 min a un flujo de 3 mL/min. Esta técnica cromatográfica se ha empleado anteriormente para purificar péptidos antiinflamatorios (Seber *et al.*, 2012). Se recogieron diecisiete fracciones (F1-F17), y el rendimiento en peso después de la purificación por RPC de cada fracción fue evaluado (Tabla 13).

**Tabla 13.** Valores de rendimiento en peso después de la purificación por cromatografía de fase reversa.

| Fracción | Rendimiento en peso (%) |
|----------|-------------------------|
| F1       | 7.13                    |
| F2       | 1.89                    |
| F3       | 10.04                   |
| F4       | 15.42                   |
| F5       | 16.45                   |
| F6       | 10.04                   |
| F7       | 5.38                    |
| F8       | 2.47                    |
| F9       | 4.80                    |
| F10      | 6.98                    |
| F11      | 2.76                    |
| F12      | 6.11                    |
| F13      | 2.33                    |
| F14      | 2.33                    |
| F15      | 1.60                    |
| F16      | 1.75                    |
| F17      | 2.32                    |

La actividad antiinflamatoria de las 17 fracciones se evaluó midiendo la expresión de TNF e IL-1 $\beta$  por PCR cuantitativa, siendo positivo (+) en los casos en los

que las fracciones reprimían la expresión del gen y negativo (-) para el caso contrario (Figura 33). Como se puede observar sólo en dos fracciones, F3 y F7, se observó una reducción de la expresión génica de ambas citoquinas.

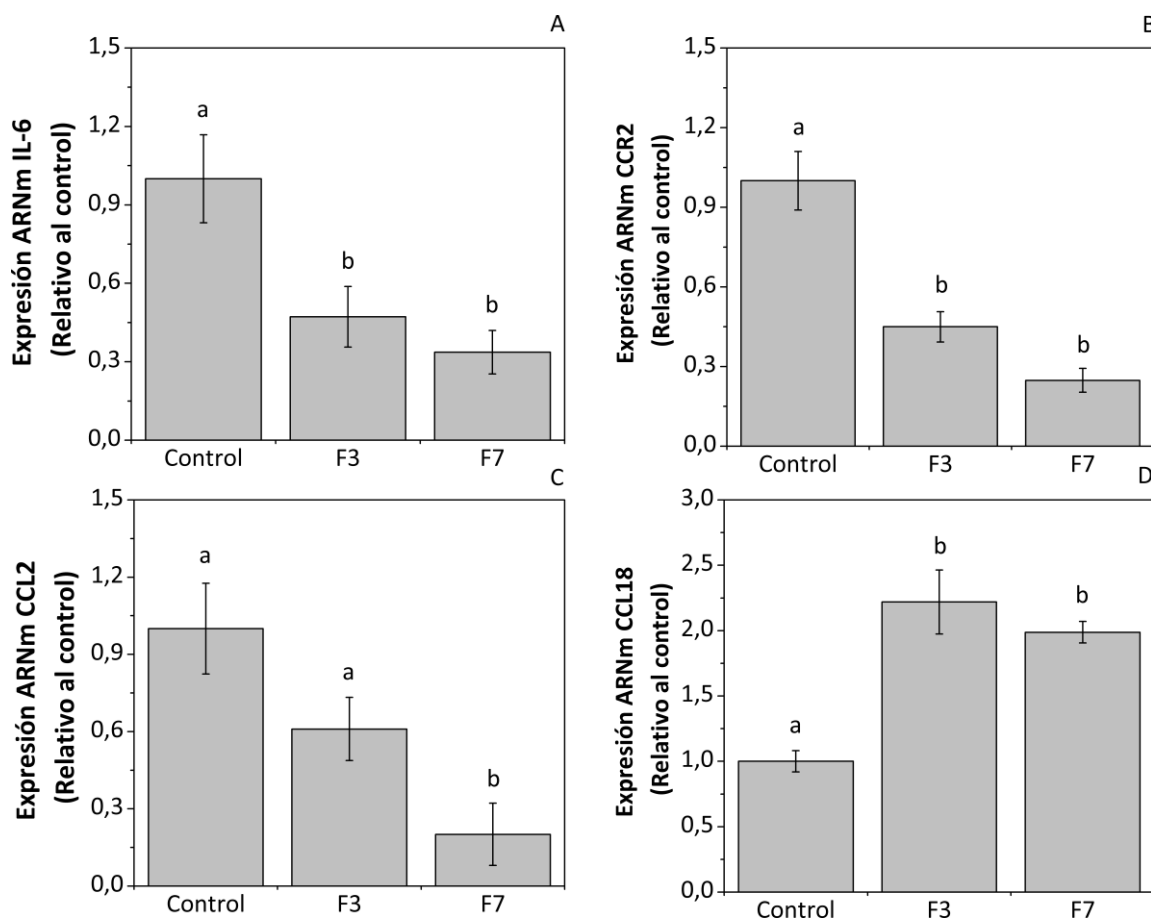


**Figura 33.** Perfil de elución de la fracción PM2 (<10 kDa) mediante cromatografía de fase reversa. Se recogieron 17 fracciones y se midió la expresión del ARNm de TNF e IL-1 $\beta$  en macrófagos derivados de THP-1.

A continuación, se evaluó la expresión de las citoquinas IL-6, CCR2, CCL2 y CCL18 para comprobar cuál de las dos fracciones presentaba un mayor potencial antiinflamatorio. El análisis de la expresión génica mostró una reducción significativa



de la expresión de CCR2 para F3 y F7 que no habían sido reprimidas por las fracciones obtenidas por ultrafiltración (Figura 34B). La expresión de su ligando CCL2, fue reprimida de manera significativa por F7, aunque se observó una tendencia a la reducción también en el caso de F3 (Figura 34C). Además, la expresión de IL-6 se redujo tanto por F3 como por F7 de manera significativa con respecto al control, no encontrándose diferencias significativas entre ambas fracciones con respecto a su actividad reductora de esta citoquina (Figura 34A). Por otro lado, la expresión de CCL18 fue inducida por F3 y F7 (Figura 34D). Analizando tanto los resultados obtenidos por PCR cuantitativa como los correspondientes al rendimiento en peso, se seleccionó la fracción F3 para continuar el proceso de purificación de péptidos antiinflamatorios, ya que ambas fracciones mostraban una buena actividad antiinflamatoria, y F3, además, presentaba un rendimiento en peso de casi el doble que F7 después de la purificación por RPC (Tabla 13).

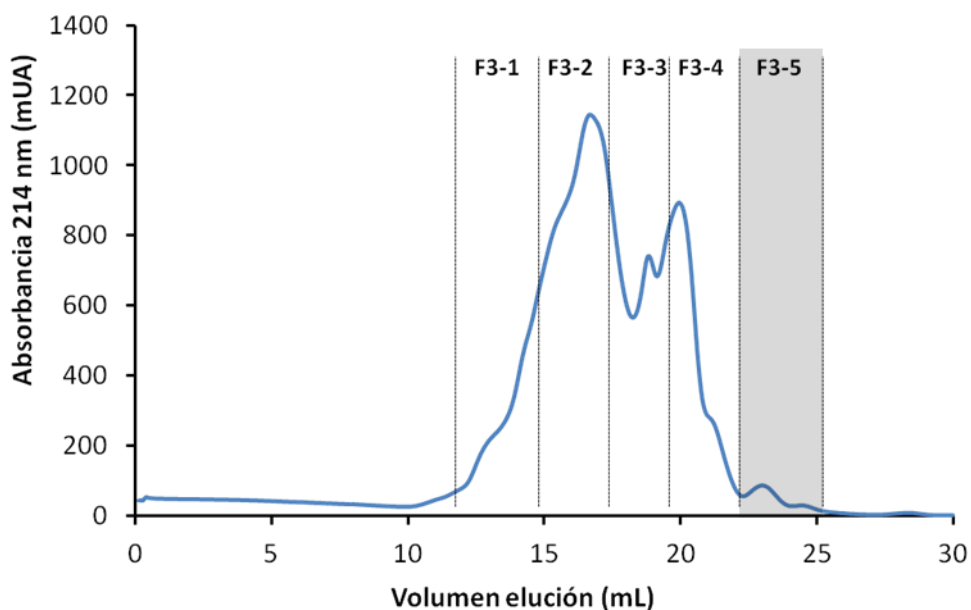


**Figura 34.** Expresión de ARNm de IL-6 (A), CCR2 (B), CCL2 (C), y CCL18 (D) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con F3 y F7 obtenidas por cromatografía de fase reversa (columna RPC 3 mL). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4.3. Purificación de F3 por cromatografía filtración en gel.

La cromatografía de filtración en gel se ha utilizado en numerosos estudios para, la purificación e identificación de péptidos bioactivos, a partir de hidrolizados de proteínas de varias fuentes vegetales, como la soja (Kim *et al.*, 2007). La fracción F3 obtenida por cromatografía de fase reversa se inyectó en una columna Superdex peptide, recogiendo cinco fracciones nombradas como F3-1, F3-2, F3-3, F3-4, y F3-5 (Figura 35). La expresión de TNF y la IL-1 $\beta$  se evaluó mediante PCR cuantitativa, siendo

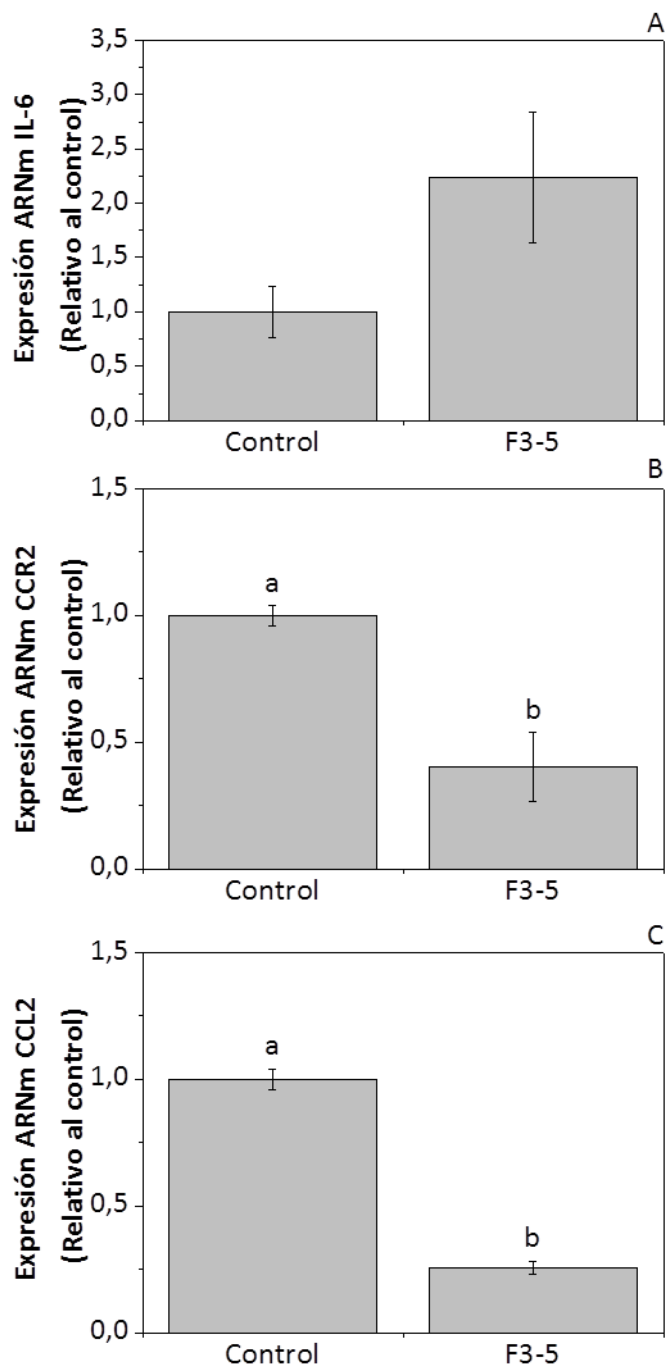
positiva (+) en los casos en los que las fracciones reprimieron la expresión de las citoquinas y negativa (-) para el caso contrario. Sólo F3-5 mostró un resultado positivo para la expresión de TNF, por lo tanto, esta fracción fue elegida para el resto del análisis.



|     |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|
| TNF | - | - | - | - | + |
| IL1 | - | - | - | - | - |

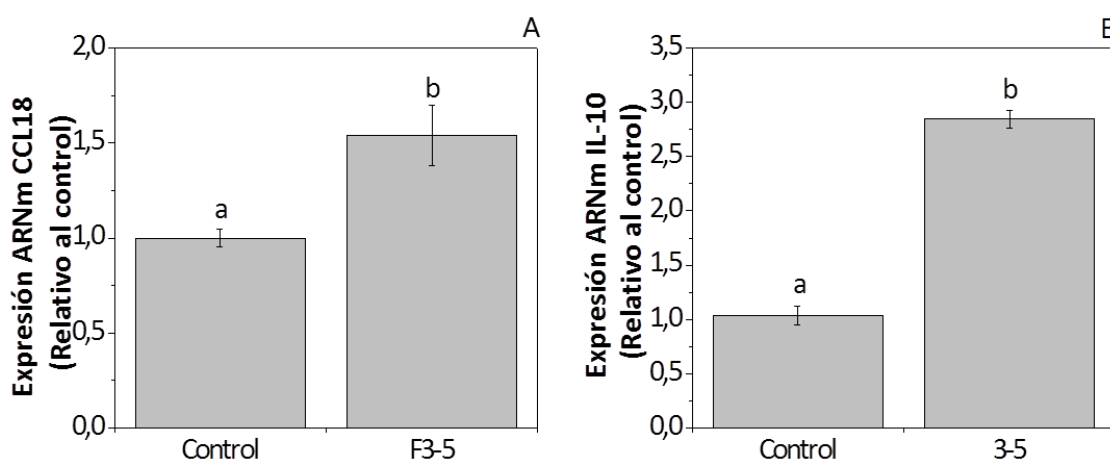
**Figura 35.** Perfil de elución de F3 obtenida en una columna de filtración en gel Superdex peptide 10/300.

Seguidamente, se evaluaron el resto de citoquinas para la fracción F3-5. No se observaron diferencias significativas en el caso de la expresión de IL-6 (Figura 36A). Sin embargo, se observó una reducción drástica en la expresión de CCR2 y CCL2 por F3-5, (-59,54%) y (-74,45%), respectivamente (Figura 36B y 36C). Estos resultados indican que F3-5 tiende a disminuir la capacidad proinflamatoria de los macrófagos M1 activados por la reducción de la expresión de algunas citoquinas proinflamatorias.



**Figura 36.** Expresión de ARNm de IL-6 (A), CCR2 (B) y CCL2 (C) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con F3-5 obtenida por cromatografía de filtración en gel (columna Superdex peptide 10/300). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Con el objetivo de corroborar esta afirmación, se evaluó la capacidad de F3-5 para modular los niveles de CCL18 e IL-10. Ambas citoquinas antiinflamatorias juegan un papel crucial en la prevención de patologías inflamatorias y autoinmunes (Moore *et al.*, 2001; Krohn *et al.*, 2013). Tanto los niveles de expresión de CCL18 como de IL-10 fueron inducidos de forma significativa con respecto al control sin tratamiento por F3-5 (Figura 37A y 37B) siendo una prueba más para reafirmar la hipótesis de que F3-5 podría ser una fracción peptídica con una potencial actividad antiinflamatoria.



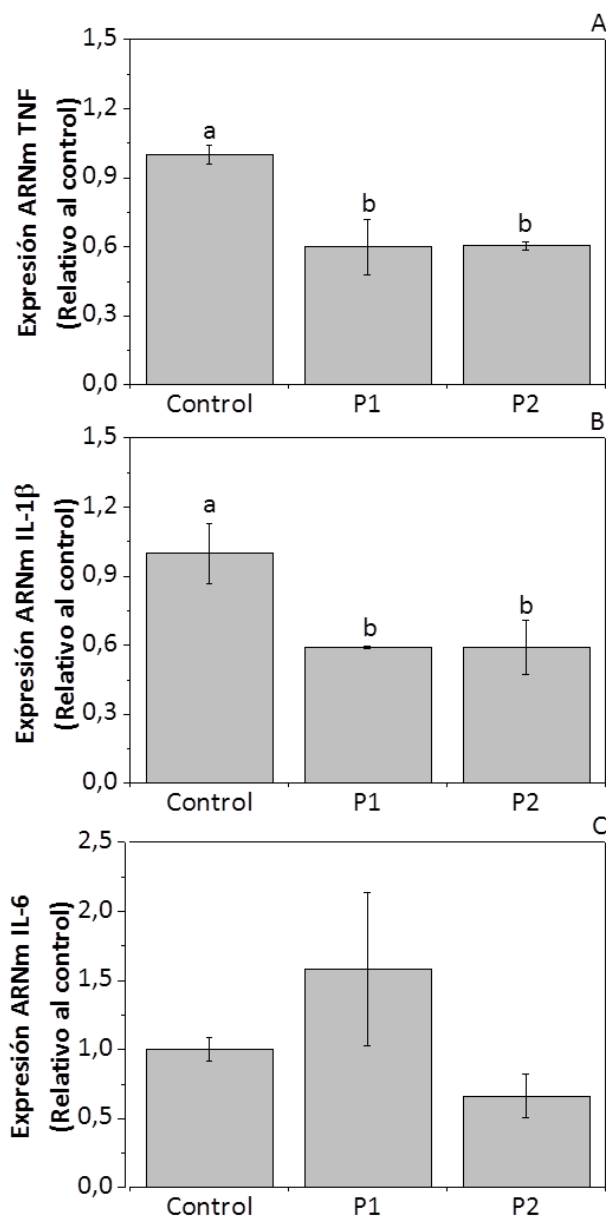
**Figura 37.** Expresión de ARNm de CCL18 (A) e IL-10 (B) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con la fracción F3-5. Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

La fracción F3-5 fue analizada por espectrometría de masas, siendo identificado un péptido mayoritario de 889.6 Da cuya secuencia fue **Gly-Pro-Glu-Thr-Ala-Phe-Leu-Arg** (8-Lupep). Este péptido fue sintetizado para probar su actividad antiinflamatoria en los macrófagos derivados de THP-1 mediante el análisis de la expresión de citoquinas por PCR cuantitativa, y la determinación de la secreción de estas proteínas mediante ensayos ELISA. Además se determinó su actividad sobre la liberación de NO.

#### **4.5. Estudio de la actividad antiinflamatoria del péptido sintético.**

Los macrófagos derivados de THP-1 fueron tratados con el péptido sintético a dos concentraciones diferentes: a la concentración menor de 100 µg/mL se le nombró como P1 y a la más elevada correspondiente a 500 µg/mL como P2.

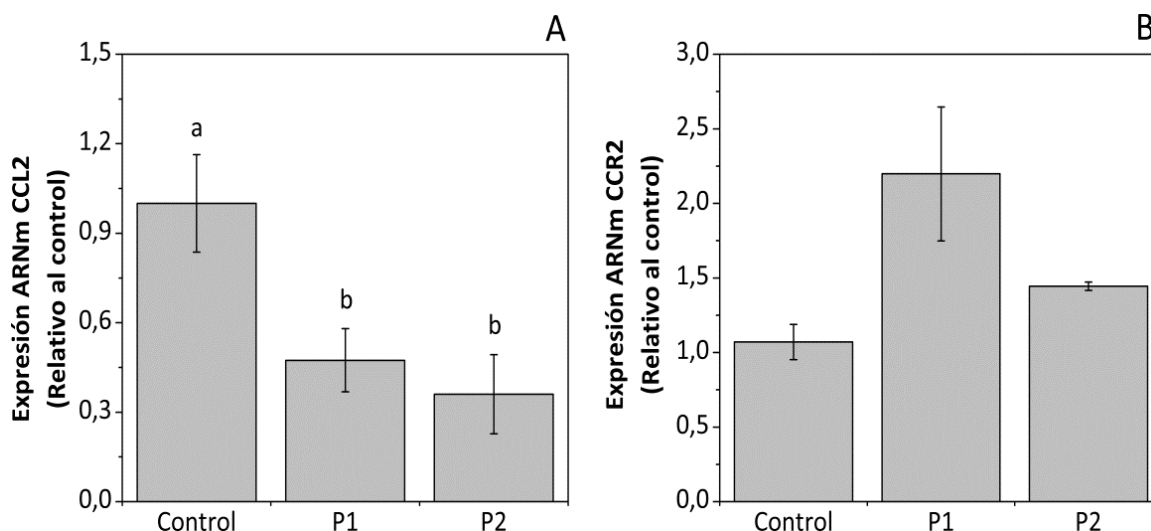
Como se puede observar en la Figura 38, la expresión de TNF (Figura 38A) e IL-1β (Figura 38B) se reprimió significativamente con respecto al control, y no se observaron diferencias entre los tratamientos. Por otro lado P1 parecía inducir la expresión de la IL-6 mientras que P2 parecía reducir dicha expresión. De todos modos, con ninguno de los dos tratamientos se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control en la expresión de la IL-6. Este primer estudio mostraba una vez más que el péptido, anteriormente purificado a partir del hidrolizado y ahora sintetizado a partir de su secuencia, presentaba una potencial actividad antiinflamatoria por reducir la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF e IL-1β a las concentraciones anteriormente usadas e incluso a una dosis 5 veces inferior a la usada en los ensayos anteriores.



**Figura 38.** Expresión de ARNm de TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), e IL-6 (C) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con el péptido sintetizado a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P1) y a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P2). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En cuanto al efecto del péptido 8-Lupez sobre la capacidad quimiotáctica de los macrófagos derivados de THP-1 humanos se observó que contribuyó a una reducción significativa de la expresión del ligando CCL2 (Figura 39A). Su receptor CCR2, sin

embargo, no mostró diferencias con respecto al control después del tratamiento (Figura 39B). Estos resultados sugieren que la infiltración de macrófagos activados expuestos a distintas concentraciones del péptido sintetizado puede perder su capacidad quimiotáctica, lo que contribuiría a una mejora del estado inflamatorio.

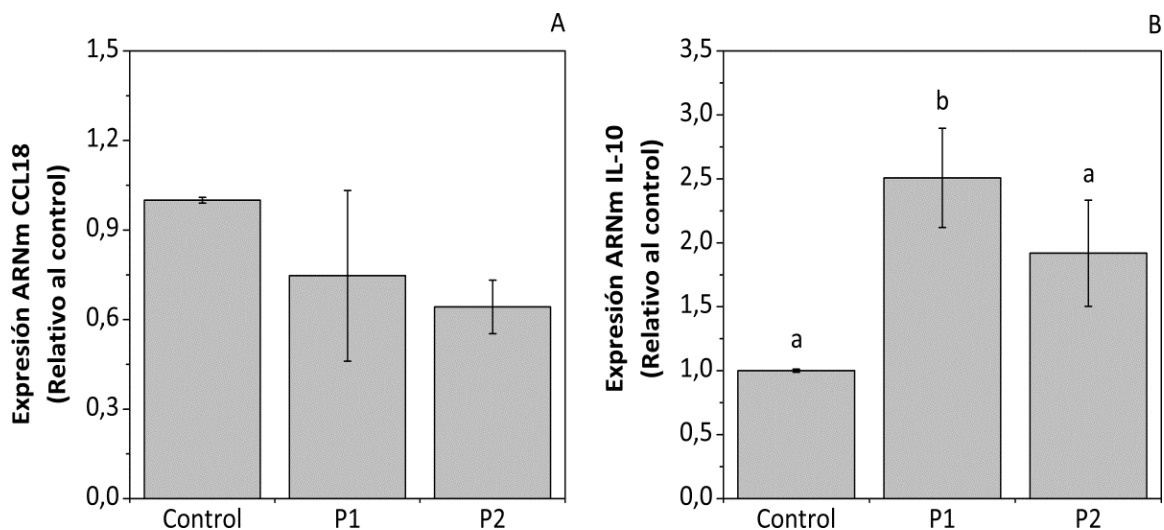


**Figura 39.** Expresión de ARNm de CCL2 (A) y CCR2 (B) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con el péptido a la concentración de 100 µg/mL (P1) y de 500 µg/mL (P2). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, el análisis de las citoquinas antiinflamatorias (Figura 40) mostró una pequeña diferencia con la fracción F3-5, ya que para ésta, se obtuvieron valores de expresión de CCL18 mucho más altos que el control y en este caso, con el péptido a cualquiera de las concentraciones usadas, no se observaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 40A). Esto no fue así para la expresión de la IL-10 que fue inducida de manera significativa por el péptido a la concentración más baja (Figura 40B). Estas pequeñas diferencias sobre la expresión de las citoquinas pro y antiinflamatorias, entre la fracción F3-5 obtenida tras la purificación mediante ultrafiltración y técnicas cromatográficas y, el péptido sintetizado pueden deberse a la



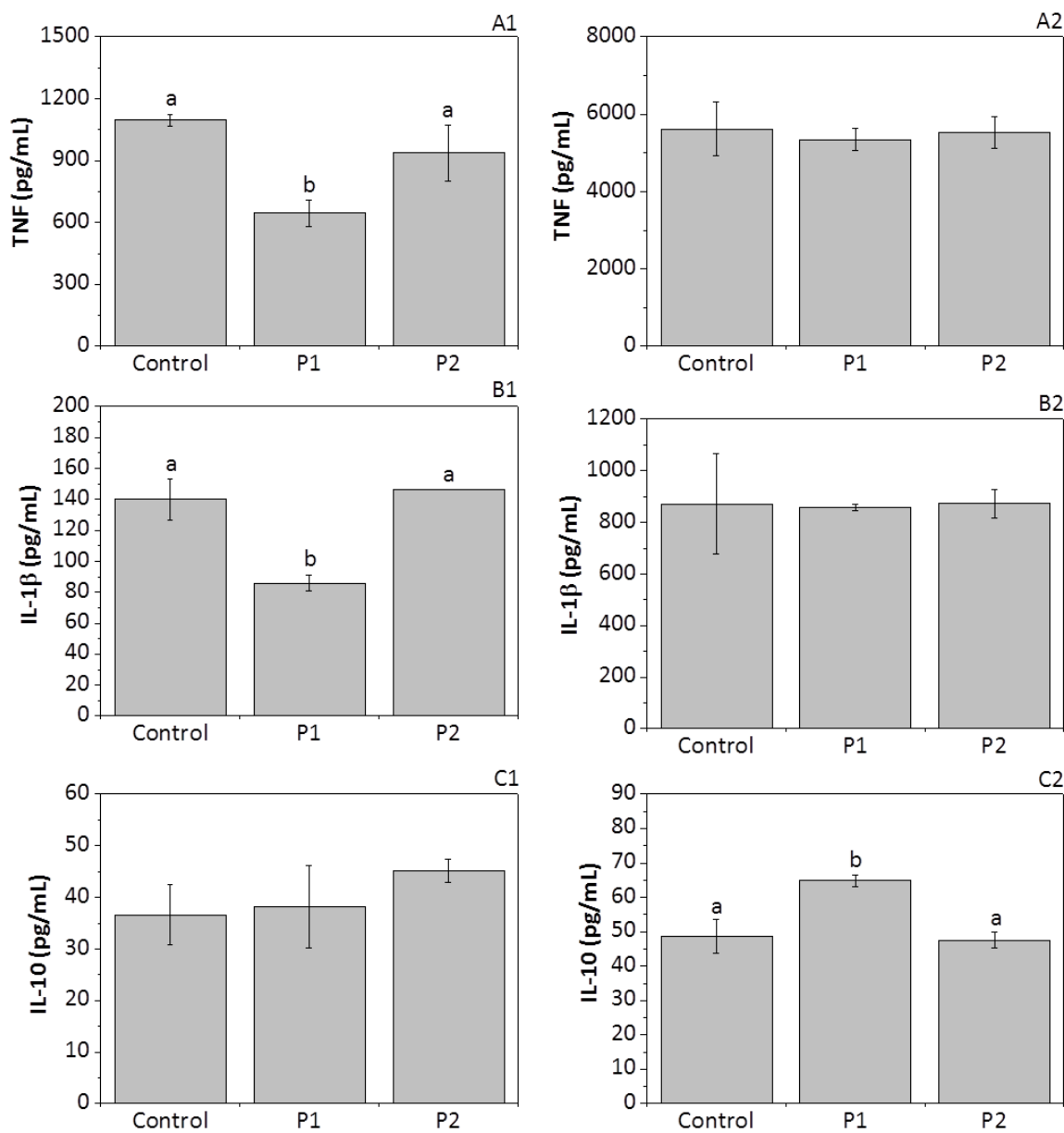
interacción de las células con alguna secuencia aminoacídica minoritaria diferente al péptido sintetizado.



**Figura 40.** Expresión de ARNm de CCL18 (A) e IL-10 (B) en macrófagos derivados de THP-1 después de 6 h de tratamiento con el péptido a la concentración de 100 µg/mL (P1) y de 500 µg/mL (P2). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Para demostrar el efecto antiinflamatorio del péptido, se determinó también la concentración de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos celulares después de los tratamientos, a las dos concentraciones anteriormente descritas y a distintas horas (6 h y 48 h), para observar las posibles fluctuaciones en los niveles de proteínas ya que, cada una de ellas presenta diferentes tasas de renovación. La producción de TNF y de IL-1 $\beta$  fue disminuida después de 6 h por el péptido a la concentración de 100 µg/mL de forma significativa con respecto al control, siendo, además, diferente a la obtenida con el péptido a la concentración mayor (Figura 41A1 y 41B1, respectivamente). Estos datos coinciden en parte con los obtenidos por PCR cuantitativa, en los que la adición de ambas concentraciones del péptido al medio de reacción provocó una reducción significativa de la expresión de ambas citoquinas proinflamatorias. Para la IL-10, hay que esperar a las 48 h para observar el aumento en

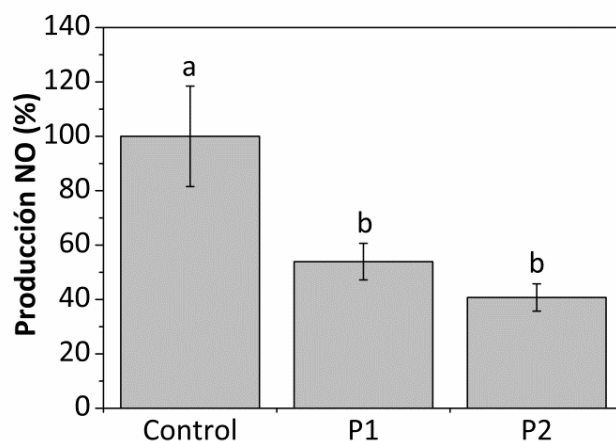
la producción de la citoquina (Figura 41C2), siendo 0significativamente diferente con respecto al control. Por lo tanto, es la dosis más baja del péptido ó P1 (100 µg/mL) la que actúa tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, ejerciendo un efecto antiinflamatorio a corto plazo (6 h) mediante la inhibición de la secreción de TNF e IL-1β y a más largo plazo (48 h) por su capacidad de inducir la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10.



**Figura 41.** Efecto sobre la producción de TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), e IL-10 (C) de los macrófagos derivados de células THP-1 después de 6 h (1) y 48 h (2) de tratamiento con dos concentraciones del péptido sintetizado, P1 (100  $\mu$ g/mL) y P2 (500  $\mu$ g/mL). Los valores marcados con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Por último, se evaluó el efecto del péptido a diferentes concentraciones (P1 y P2) sobre la liberación del NO (Figura 42). La reducción significativa del porcentaje de NO producido por los macrófagos después de la exposición durante 48 h con el péptido a 100  $\mu$ g/mL y 500  $\mu$ g/mL, demuestra una vez más, la actividad

antiinflamatoria del péptido sintetizado por su capacidad de inhibir este mediador inflamatorio.



**Figura 42.** Porcentaje de producción de óxido nítrico (NO) en el sobrenadante de los macrófagos derivados de THP-1 después de 48H de tratamiento con el péptido a 100 µg/mL (P1) y 500 µg/mL (P2).

En resumen puede concluirse que el péptido identificado como **Gly-Pro-Glu-Thr-Ala-Phe-Leu-Arg** presenta actividad antiinflamatoria *in vitro* a través del estudio de la expresión de diversas citoquinas por PCR cuantitativa, y el análisis de los niveles de estas proteínas por ELISA y NO involucrados en procesos inflamatorios. Hasta la fecha, sólo se ha identificado un péptido conocido como lunasina a partir de harina de soja desengrasada usando la línea celular de macrófagos RAW264.7 como modelo *in vitro* (Dia *et al.*, 2009). Sin embargo, este es el primer péptido con actividad antiinflamatoria purificado a partir de los hidrolizados de proteínas de *Lupinus angustifolius* L.

## **5. CONCLUSIONES.**



1. Los hidrolizados obtenidos a partir del aislado proteico de altramuz mediante las proteasas Izyme AL y Alcalase 2.4 L, inhibieron las siguientes enzimas implicadas en la ruta inflamatoria: PLA<sub>2</sub>, COX-2, trombina y TG. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la ecuación de Lineawer Burk mostraron que, los hidrolizados inhibieron de forma competitiva la actividad enzimática de PLA<sub>2</sub> y trombina, y de forma no competitiva (mixta) la actividad de las enzimas COX-2 y TG.

2. Los hidrolizados nombrados como 60I+15A y 15A, mostraron las mayores inhibiciones enzimáticas y su actividad antiinflamatoria, fue evaluada en un modelo de macrófagos derivados de THP-1. Estos hidrolizados presentaron una composición química y un perfil aminoacídico similar al aislado de partida.

3. El estudio sobre la posible toxicidad de los hidrolizados proteicos sobre las células fue evaluado mediante ensayos de viabilidad con azul de tripán, estudios de citotoxicidad por el método del MTT, y estudios de sobre el contenido de ADN y apoptosis con anexina V por citometría de flujo. Los hidrolizados no mostraron ningún efecto sobre la integridad de la membrana celular de los macrófagos derivado de THP-

4. Los hidrolizados tienden a disminuir la capacidad proinflamatoria de los macrófagos M1 activados con PMA por la reducción significativa de la expresión de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 y el aumento de la expresión de la citoquina antiinflamatoria CCL18 evaluadas por PCR cuantitativa. Además inhibieron la producción de TNF evaluado por ELISA en el sobrenadante de los macrófagos después de 48 h de tratamiento, así como la producción de NO.

5. Los hidrolizados mostraron un efecto beneficioso sobre el mecanismo de quimiotaxis por la modulación de la vía CCR2/CCL2 al reprimir significativamente la expresión del receptor de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) por PCR cuantitativa, así como una disminución del índice de migración tras 24 h de tratamiento, por lo que de esta manera, contribuirían a una mejora del estado inflamatorio.

6. El hidrolizado 15A, seleccionado por su potencial actividad antiinflamatoria, unido a su mayor riqueza proteica y menor coste de producción con respecto al hidrolizado 60I+15A, fue purificado por ultrafiltración obteniéndose dos fracciones,

PM1 y PM2. La fracción PM2 (<10 kDa) mostró mayor actividad antiinflamatoria por la represión génica de TNF y CCR2.

7. La fracción PM2 fue purificada por cromatografía de fase reversa y se obtuvieron 17 fracciones denominadas como F1-F17. Únicamente, las fracciones F3 y F7 reprimieron la expresión de TNF e IL-1 $\beta$ . Ambas fracciones redujeron, además, la expresión de los genes IL-6, CCR2 e indujeron la expresión de la citoquina antiinflamatoria CCL18.

8. La fracción F3 con mayor rendimiento en peso que F7, fue elegida para su purificación por cromatografía de filtración en gel. De las cinco subfracciones obtenidas (F3-1, F3-2, F3-3, F3-4 y F3-5) sólo la última reprimió de forma significativa la expresión de TNF. Su actividad antiinflamatoria fue corroborada por su actividad reductora de la expresión de las citoquinas CCR2 y CCL2, así como por el aumento de expresión de IL-10 y CCL18.

9. La fracción F3-5 fue analizada por espectrometría de masas, siendo identificado un péptido mayoritario de 889.6 Da, cuya secuencia fue **Gly-Pro-Glu-Thr-Ala-Phe-Leu-Arg**.

10. La actividad antiinflamatoria del péptido sintético fue estudiada por PCR cuantitativa, ELISA y NO en macrófagos derivados de THP-1 después del tratamiento con dos concentraciones diferentes de 100  $\mu$ g/mL (P1) y 500  $\mu$ g/mL (P2). Ambas concentraciones reprimieron la expresión de TNF, IL-1 $\beta$  y CCL2, y sólo P1 indujo de forma significativa con respecto al control, la expresión de la IL-10. Por ELISA, es también la concentración de 100  $\mu$ g/mL la que inhibió la secreción de TNF e IL-1 $\beta$  a 6 h y aumentó la de la IL-10 a las 48 h. Ambas fracciones redujeron de forma significativa la producción del mediador inflamatorio NO.

11. Por todo esto, podemos concluir que el péptido aislado a partir de los hidrolizados proteicos de altramuz muestra una actividad antiinflamatoria in vitro, siendo este el primer estudio sobre un péptido de altramuz con esta actividad biológica.



## **6. BIBLIOGRAFÍA.**



- Abbenante, G., & Fairlie, D.P. (2005). Protease inhibitors in the clinic. *Medicinal Chemistry, 1*, 71-104.
- Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y., & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En "Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias". (Segura Campos, M., Chel Guerrero, L., & Betancur Ancona, D. Eds.). Omni-science. DOI: <http://doi.org/10.3926/oms.38>
- Adebiyi, A.P., & Aluko, R.E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry, 128*, 902-908.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*, 1256-1262.
- Agyei, D., & Danquah, M.K. (2012). Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology, 23*, 62-69.
- Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Kim, Y.-T., & Je, J.-Y. (2012). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochemistry, 47*, 2240-2245.
- Aider, M., & Barbana, C. (2011). Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends in Food Science & Technology, 22*, 21-39.
- Alabdulkarim, B., Abdel, Z., Bakeet, N., & Arzoo, S. (2012). Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University- Science, 24*, 319-329.
- Alaiz, M., Navarro, J.L., Giron, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography, 591*, 181-186.

- Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jensen, E., Jacobsen, M., Langsrud, T., & Vegarud, G.E. (2011). Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *British Journal of Nutrition*, *106*(6), 896-905.
- Alsohaimy, S.A., Sitohy, M.Z., & El-Masry, R.A. (2007). Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. *World Journal of Agricultural Science*, *3*(1), 123-127.
- Aluko, R.E. (2008). Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. *Journal of AOAC International*, *91*, 947-956.
- Amengual, O., Atsumi, T., & Koike, T. (2004). Antiprothombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology*, *112*, 144-149.
- Anson, M.L. (1938). The stimulation of pepsin, trypsin, papain and cathesin with hemoglobin. *Journal General Physiology*, *22*, 79-89.
- Arreozola, M.I.R., Aguilar, G.C.N., Prado, B.L.A., & Martínez, H.J.L. (2011). Residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngicas. *Cienciacierta*, *27*, 20-23.
- Artemova, N.V., Bumagina, Z.M., Kasakov, A.S., Shubin, V.V., & Gurvits, B.Y. (2010). Opioid peptides derived from food proteins suppress aggregation and promote reactivation of partly unfolded stressed proteins. *Peptides*, *31*, 332-338.
- Ascaso, J.F. (2010). Avances en el tratamiento de la hipercolesterolemia. *Endocrinología y Nutrición*, *57*, 210-219.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, *47*, 22-31.
- Baldeón, M.E., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., & Fornasini, M. (2012). Hypoglycemic effect of cooked *lupinus mutabilis* and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutrición Hospitalaria*, *27*, 1261-1266.
- Barac, A., Wang, H., Shara, N.M., Simone, G., Carter, E.A., Umans, J.G., Best, L.G., Yeh, J., Dixon, D.B., Devereux, D.B., Howard, B.V., & Panza, J.A. (2012). Markers of

- inflammation, metabolic risk factors, and incident heart failure in American Indians: the Strong Heart Study. *The Journal of Clinical Hypertension*, *14*, 13-19.
- Barbana, C., & Boye, I.J. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, *43*, 1642-1649.
- Barros de Oliveira, M.C., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira Anestesiologia*, *61*, 137-142.
- Barzyk, W., Rogalska, E., & Więclaw-Czapla K. (2013). Penetration of milk-derived antimicrobial peptides into phospholipid monolayers as model biomembranes. *Biochemistry research international*, *2013*, 2013-914540. DOI: 10.1155/2013/914540.
- Bautista, J., Corpas, R., Cremades, O., Hernández-Pinzón, I., Ramos, R., Villanueva, A., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Vioque, J., Parrado, J., & Millán, F. (2000). Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*, 121-126.
- Bellón, T., Martínez, V., Lucendo, B., del Peso, G., Castro, M.J., Aroeira, L.S., Rodríguez-Sanz, A., Ossorio, M., Sánchez-Villanueva, R., Selgas, R., & Bajo, M.A. (2011). Alternative activation of macrophages in human peritoneum: Implications for peritoneal fibrosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, *26*, 2995-3005.
- Belski, R. (2012). Fibra, proteína y altramuz alimentos enriquecidos: papel para mejorar la salud cardiovascular. *Advances in Food and Nutrition Research*, *66*, 147-215.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *42*, 227-236.
- Berger, J.D., Buirchell, B.J., Luckett, D.J., Palta, J.A., Ludwig, C., & Liu, D.L. (2012). How has narrow-leafed lupin changed in its 1st 40 years as an industrial, broad-acre crop? A G × E-based characterization of yield-related traits in Australian cultivars. *Field Crops Research*, *126*, 152-164.
- Bhardwaj, L.H. (2010). Preliminary evaluation of white lupin (*Lupinus albus* L.) as a forage crop in the Mid-Atlantic region of the United States of America. *Journal of Agricultural Science*, *2*, 13-17.

- Blenford, D.E. (1996). Winner drinks. Use of amino acids and peptides in sports nutrition. *International Food Ingredients*, 3, 20-23.
- Boschin, G., Scigliuolo, G.M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414-431.
- Boza, J.J., Möennoz, D., Vuichoud, J., Jarret, A.R., Guadard-de-Weck., D., & Ballèvre, O. (2000). Protein hydrolysates vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutrition*, 39, 237-243.
- Brown, C.J., Lim, J.J., Leonard, T., Lim, H.C., Chia, C.S., Verma, C.S., & Lane, D.P. (2011). Stabilizing the eIF4G1  $\alpha$ -helix increases its binding affinity with eIF4E: implications for peptidomimetic design strategies. *Journal of Molecular Biology*, 405(3), 736-753.
- Cabanillas, B., Pedrosa, M.M., Rodríguez, J., González, A., Muzquiz, M., Cuadrado, C., Crespo, J.F., & Burbano, C. (2010). Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1266-1272.
- Cabrera-Padilla, R.Y., Pinto, G.A., Giordano, R.L.C., & Giordano, R.C. (2009). A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochemistry*, 44, 269-276.
- Capraro, J., Spotti, P., Magni, C., Scarafoni, A., & Duranti, M. (2010). Spectroscopic studies on the pH-dependent structural dynamics of  $\gamma$ -conglutin, the blood glucose-lowering protein of lupin seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 502-507.
- Carrasco, A.C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23(1), 42-49.

- Carrillo, J., Salazar, M., Hernández, R., Huerta, S., & Prado, A. (2008). Caracterización de la cinética de producción de proteasas fúngicas por fermentación en medio sólido a partir de una cepa aislada de queso Philadelphia. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Carvalho-Silva, L.B., Bertoldo Pacheco, M.T., Bertoldo, R., Carvalho Veloso, C., Costa Teodoro, L., Giusti-Paiva Pablo, A., Barboza Lollo, C., & Soncini, R. (2012). Anti-inflammatory activities of enzymatic (alcalase) hydrolysate of a whey protein concentrate. *African Journal of Biotechnology*, *11*, 2993-2999.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., & Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, *42*, 1419-1428.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. & Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Acibia, S.A.
- Chethankumar, M. (2010). Turmerin, a protein from *Curcuma longa* L. prevent oxidative organ damage against *Naja naja* venom phospholipase A2 in experimental animal. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, *3*, 29-34.
- Chiofalo, B., Lo Presti, V., Chiofalo, V., & Gresta, F. (2012). The productive traits, fatty acid profile and nutritional indices of three lupin (*Lupinus* spp.) species cultivated in a Mediterranean environment for the livestock. *Animal Feed Science and Technology*, *171*, 230-239.
- Chirino, Y.I., Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica*, *58*, 350-358.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *11*, 254-262.
- Cunningham, T.J., Maciejewski, J., & Yao, L. (2006). Inhibition of secreted phospholipase A2 by neuron survival and anti-inflammatory peptide CHEC-9. *Journal of Neuroinflammation*, *3*, 25. DOI: 10.1186/1742-2094-3-25.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., & Dockrell, D.H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated

- THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 5(1), e8668. DOI:10.1371/journal.pone.0008668.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants-Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32, 25-42.
- Dia, V.P., Wang, W., Oh, V.L., de Lumen, B.O., & Gonzalez de Mejia, E. (2009). Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 114, 108-115.
- Dickinson, E. & Casanova, H. (1999). A thermovisible emulsion gel based on sodium caseinate. *Food Hydrocolloides*, 13(4), 285-289.
- Dove, E.R., Mori, T.A., Chew, G.T., Barden, A.E., Woodman, R.J., Puddey, I.B., Sipsas, S., & Hodgson, J.M. (2011). Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106, 1045-1051.
- Drakos, A., Doxastakis, G., & Kiosseoglou, V. (2007). Functional effects of lupin proteins in comminuted meat and emulsion gels. *Food Chemistry*, 100, 650-655.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Reber, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Duque Correa, M.A., & Rojas López, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26, 73-86.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- Duranti, M., Lovati, M.R., Dani, V., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Castiglioni, S., & Morazzoni, P. (2004). The  $\alpha'$  subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver  $\beta$ -VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *The Journal of Nutrition*, 134, 1334-1339.
- Eliécer, C.J. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1(1), 10-15.



- Erdogdu-Arnoczky, N., Czuchajowska, Z., & Pomeranz, Y. (1996). Functionality of whey and casein in fermentation and in breadbaking by fixed and optimized procedures. *Cereal Chemistry*, *73*, 309-316.
- Eric, K., Raymond, L.V., Huang, M., Cheserek, M.J., Hayat, K., Savio, N.D., Amédée, M., & Zhang, X. (2013). Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysates model system. *Food Research International*, *54*, 1437-1447.
- Fechner, A., Schweiggert, U., Hasenkopf, K., & Jahreis, G. (2011). Chapter 42 - Lupine kernel fiber: metabolic effects in human intervention studies and use as a supplement in wheat bread. En V. Preedy, R. Watson & V. Patel (Eds.), *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (pp. 463-473): Academic Press.
- Fernandes, E., Schmidhuber, S.M., & Brain, S.D. (2009). Sensory-nerve-derived neuropeptides: Possible therapeutic targets. En "Handbook of Experimental Pharmacology". (Canning, B.J., & Spina, B. Eds.) Springer.
- Fiocchi, A., Travaini, M., D'Auria, E., Banderali, G., Bernardo, L., & Riva, E. (2003). Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clinical & Experimental Allergy*, *33*, 1576-1580.
- Foegeding, E.A., Luck, P.J., & Davis, J.P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, *20*, 284-292.
- Fontanari, G.G., Batistuti, J.P., Cruz, R.J., Saldiva, P.H.N., & Arêas, J.A.G. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, *132*, 1521-1526.
- Frontela, C., Ros, G., & Martínez, C. (2008). Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *58*, 215-220.
- García-Tejedor, A., Padilla, B., Salom, J.B., Belloch, C., & Manzanares, P. (2013). Dairy yeasts produce milk protein-derived antihypertensive hydrolysates. *Food Research International*, *53*, 203-208.

- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, *37*, 123-131.
- Gierse, J.K., Koboldt, C.M., Walker, M.C., Seibert, K., & Isakson, P.C. (1999). Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochemical Journal*, *339*, 607-614.
- Goggin, D.E., Mir, G., Smith, W.B., Stuckey, M., & Smith, P.M.C. (2008). Proteomic analysis of lupin seed proteins to identify conglutin  $\beta$  as an allergen, Lup an 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 6370-6377.
- Green, L.C., Wanger, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., & Tannenbaum, S.R. (1981). Analysis of nitrate, nitrite, [15N]-nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*, 131-138.
- Guadagnucci Fontanari, G., Paschoal Batistuti, J., da Cruz, R.J., Nascimento Saldiva, P.H., & Gomes Arêas, J.A. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, *132*, 1521-1526.
- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, *41*, 79-89.
- Guillamón, E., Pedrosa, M.M., Burbano, C., Cuadrado, C., Sánchez, M.C., & Muzquiz, M. (2008). The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry*, *107*, 68-74.
- Gülden, M., & Seibert, H. (2003). In vitro-in vivo extrapolation: Estimation of human serum concentrations of chemicals equivalent to cytotoxic concentrations in vitro. *Toxicology*, *189*, 211-222.
- Gupta, S.C., Prasad, S., Kim, J.H., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, I.K., & Aggarwal, B.B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Reports*, *28*, 1937-1955.
- Hajer, G.R., van Haeften, T.W., & Visseren, F.L.J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, *29*, 2959-2971.

- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, 18*, 163-169.
- He, R., Girgihb, T.A., Malomo, A.S., Jud, X., & Aluko, E.R. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods, 5*, 219-227.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M.M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science, 165*, 23-35.
- Honig, D.H., Rackis, J.J., & Wolf, W.J. (1987). Effects of pH and salt on yields, trypsin inhibitor content, and mineral levels of soybean protein isolates and wheys. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 35*, 967-971.
- Ialenti, A., Santagada, V., Caliendo, G., Severino, B., Fiorino, F., Maffia, P., Ianaro, A., Morelli, F., Di Micco, B., Carteni, M., Stiuso, P., Metafora, V., & Metafora, S. (2001). Synthesis of novel anti-inflammatory peptides derived from the amino-acid sequence of the bioactive protein SV-IV. *European Journal of Biochemistry, 268*, 3399-3406.
- Ivanova, P., Chalova, V., Koleva, L., & Pishtiyski, I. (2013). Amino acid composition and solubility from sunflower meal produced in Bulgaria. *International Food Research Journal, 20*, 2995-3000.
- Jadhav, M.A., Lucas, R.C., Goldsberry, W.N., & Maurer, M.C. (2011). Design of Factor XIII V34X activation peptides to control ability to interact with thrombin mutants. *Biochimica et Biophysica Acta, 1814*, 1955-1963.
- Jeitner, T.M., Delikatny, E.J., Ahlqvist, J., Capper, H., & Cooper, A.J.L. (2005). Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochemical Pharmacology, 69*, 961-970.
- Jezierny, D., Mosenthin, R., & Bauer, E. (2010). The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology, 157*, 111-128.

- Johnson, S.K., Chua, V., Hall, R.S., & Baxter, A.L. (2006). Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. *British Journal of Nutrition*, *95*, 372-378.
- Joshi, A.D., Oak, S.R., Hartigan, A.J., Finn, W.G., Kunkel, S.L., Duffy, K.E., Das, K., & Hogaboam, C. M. (2010). Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunology*, *11*, 52.
- Kanterman, J., Sade-Feldman, M., & Baniyash, M. (2012). New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in Cancer Biology*, *22*, 307-318.
- Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, *102*, 366-374.
- Kim, H.J., Bae, I.Y., Ahn, C.-W., Lee, S., & Lee, H.G. (2007). Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *Peptides*, *28*, 2098-2103.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., & Schmidt, S. (2011). Lupin composition and possible use in bakery- A review. *Czech Journal of Food Science*, *29*, 203-211.
- Kong, X.Z., Guo, M.M., Hua, Y., Cao, D. & Zhang, C.M. (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology*, *99*, 8873-8879.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*, 945-960.
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *Food Science and Technology*, *50*, 591-598.
- Krohn, C.S., Bonvin, P., & Proudfoot, A.E.I. (2013). CCL18 Exhibits a Regulatory Role through Inhibition of Receptor and Glycosaminoglycan Binding. *PLoS ONE*, *8*(8) e72321. DOI:10.1371/journal.pone.0072321.
- Kumar, S., & Mehta, K. (2013). Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: How intimate is the relationship? *Amino Acids*, *44*, 81-88.

- Kumomura, K. (2000). Focus on FOSHU functional foods. *Food Manufacture*, 75, 30-32.
- Lai, Y.P., Mondor, M., Moresoli, C., Drolet, H., Gros-Louis, M., Ippersiel, D., Lamarche, F., & Arcand, Y. (2013). Production of soy protein isolates with low phytic acid content by membrane technologies: Impact of the extraction and ultrafiltration/diafiltration conditions. *Journal of Food Engineering*, 114, 221-227.
- Lampart-Szczapa, E. (2001). Legume and oilseeds proteins. En "Chemical and functional properties of food proteins" (Sikorski, Z.E. Ed). CRC Press.
- Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1215-1223.
- Lang, R., & Kofler, B. (2011). The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides*, 45, 1-8.
- Laparra, J.M., Alegría, A., Barberá, R., & Farré, R. (2008). Antioxidant effect of casein phosphopeptides compared with fruit beverages supplemented with skimmed milk against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Research International*, 41, 773-779.
- Lee, S.C., Prosky, L., & De Vries, J.W. (1974). Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 395-416.
- Lee, Y.P., Mori, T.A., Puddey, I.B., Sipsas, S., Ackland, T.R., Beilin, L.J., & Hodgson, J.M. (2009). Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 766-772.
- Levi, M., & Van der Poll, T. (2005). Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15, 254-259.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., & Guan, J.-L. (2007). *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2, 329-333.

- Li, H., Zhu, K., Zhou, H., Peng, W., & Guo, X. (2013). Comparative study about some physical properties, *in vitro* digestibility and immunoreactivity of soybean protein isolate for infant formula. *Plant Foods for Human Nutrition*, *68*, 124-130.
- Liu, G., & Yang, G. (2013). Modulation of Macrophage Activation and Programming in Immunity. *Journal of Cellular Physiology*, *228*, 502-512. DOI: 10.1002/jcp.24157
- Li, X-X., Han, L-J., & Chen, L-J. (2008). *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 1660-1666.
- Li, Y., Zhou, J., Huang, K., Sun, Y., & Zeng, X. (2012). Purification of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 1320-1325.
- Locati, M., Mantovani, A., & Sica, A. (2013). Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in Immunology*, *120*, 163-184.
- Lorand, L., Lockridge, O.M., Campbell, L.K., Myhrman, R., & Bruner-Lorand, J. (1971). A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma. *Analytical Biochemistry*, *44*, 221-231.
- Lovati, M.R., Manzoni, C., Gianazza, E., Arnoldi, A., Kurowska, E., Carroll, K.K., & Sirtori, C.R. (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *The Journal of Nutrition*, *130*, 2543-2549.
- Lovati, M.R., Manzoni, C., Gianazza, E., & Sirtori, C.R. (1998). Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active  $\beta$ -conglycinin subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2474-2480.
- Lqari, H., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., & Millán, F. (2004). Purification and partial characterization of storage proteins in *Lupinus angustifolius* seeds. *Grasas y Aceites*, *55*(4), 364-369.

- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Millán, F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, *76*, 349-356.
- Mahmoud, M.I., & Cordle, C.T. (2000). Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. En "Novel Macromolecules in Food Systems" (Doxastakis, G. & Kiosseoglu, V. Eds.). Elsevier Science B.V.
- Majumder, K., & Wu, J. (2011). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of ovotransferrin. *Food Chemistry*, *126*, 1614-1619.
- Manninen, A.H. (2009). Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism*, *6*, 38. DOI:10.1186/1743-7075-6-38.
- Mao, X-Y., Cheng, X., Wang, X., & Wu, S-J. (2011). Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, *126*, 484-490.
- Marrufo-Estrada, D.M., Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A., & Betancur-Ancona, D. (2013). Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolates as materials for protein hydrolysates with biological activity. *Food Chemistry*, *138*, 77-83.
- Martinez, F.O., Helming, L. & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, *27*, 451-483.
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J.A. (2013). Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestión. En "Proteomics in Foods: Principles and Applications, Food Microbiology and Foes Safety 2". (Toldrá, F., & Nollet, L.M.L. Eds). Springer Science + Bussines Media. DOI: 10.1007/987-1-4614-5626-1\_2.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2006a). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of  $\alpha$ -galactosides. *Food Chemistry*, *98*, 291-299.

- Martínez-Villaluenga, C., Sironi, E., Vidal-Valverde, C., & Duranti, M. (2006b). Effects of oligosaccharide removing procedure on the protein profiles of lupin seeds. *European Food Research and Technology*, *223*, 691-696.
- McMichael-Phillips, D.F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S.A., Howell, A., Potten, C.S., & Bundred, N.J. (1998). Effects of soy protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*, 1431S-1436S.
- Mondor, M., Ali, F., Ippersiel, D., & Lamarche, F. (2010). Impact of ultrafiltration/diafiltration sequence on the production of soy protein isolate by membrane technologies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *11*, 491-497.
- Montero-Granados, C., & Monge-Jiménez, T. (2010). Patología de la trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, *LXVII(591)*, 73-75.
- Montserrat-de la Paz, S., Fernández-Arche, M.A., Ángel-Martín, M., & García-Giménez, M.D. (2012). The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine*, *19*, 1072-1076.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, *19*, 683-765.
- Moores, R.G., McDermott, D.L., & Wood, T.R. (1948). Determination of chlorogenic acid in coffee. *Analytical Chemistry*, *20*, 620-624.
- Moreno, J.J. (2006). Effects of antinflammins on transglutaminase and phospholipase A<sub>2</sub> activation by transglutaminase. *International Immunopharmacology*, *6*, 300-303.
- Morris, R., Winyard, P.G., Blake, D.R., & Morris, C.J. (1994). Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *53*, 72-79.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J.G., & Astiasaran, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction sensory quality of Chorizo de Pamplona-a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, *59*, 251-258.



- Muranyi, S.I., Otto, C., Pickardt, C., Koehler, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2013). Microscopic characterization and composition of proteins from lupin seed (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation procedure. *Food Research International*, 54, 1419-1429.
- Nadal, S.M., Moreno, Y.M.T., & Cubero, S.J.I. (2004). Leguminosas grano en la agricultura moderna (1ª edición). Mundi-Prensa.
- Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R.E., & Matar, C. (2012). Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *European Journal of Nutrition*, 51, 29-37.
- Oda, H., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Sato, T., Xiao, J.Z., Abe, F., & Iwatsuki, K. (2013). Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1843-1849.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, S., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25, 20-33.
- Olefsky, J.M., & Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*, 72, 219-246.
- Oliva, Y., & Vega, S. (2004). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales. *Revista Salud Animal*, 26, 151-162.
- Onoue, S., Matsui, T., Kuriyama, K., Ogawaa, K., Kojo, Y., Mizumoto, T., Karaki, S.I., Kuwahara, A., & Yamada, S. (2012). Inhalable sustained-release formulation of long-acting vasoactive intestinal peptide derivative alleviates acute airway inflammation. *Peptides*, 35, 182-189.
- Osborne, T.B. (1924). The vegetable proteins. En " Monographs on Biochemistry" (2<sup>nd</sup> edition). (Osborne, T.B. Ed.). Longmans Green and Co.
- Osiecki, H. (2004). The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Alternative Medicine Review*, 9, 32-53.

- Osman, M., Mahmoud, G.I., Romeilah, R.M., & Fayed, S.A. (2011). Lupin seeds lower plasma lipid concentrations and normalize antioxidant parameters in rats. *Grasas y Aceites*, *62*, 162-170.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2006). Production of *Brassica carinata* protein hydrolysates with a high Fischer's ratio using immobilized proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7621-7627.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., & Millán, F. (2007). Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Research International*, *40*, 931-938.
- Peng, L., Yu-Long, Y., Defa, L., Sung, W.K., & Guoyao, Wu. (2007). Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, *98*, 237-252
- Peng, X., Kong, B., Xia, X., & Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, *20*, 360-365.
- Peña-Martínez, J. (1998). Inmunología (2ª edición). (Peña-Martínez, J. Ed.). Editorial Pirámide.
- Petracci, M., Bianchi, M., Mudalal, S., & Cavani, C. (2013). Functional ingredients for poultry meat products. *Trends in Food Science & Technology*, *33*, 27-39.
- Petterson, D.S. (2000). The use of lupins in feeding systems. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *13*, 861-882.
- Pihlanto, A. (2011). Whey proteins and peptides. *Nutrafoods*, *10*, 29-42.
- Pisariková, B., Zraly, Z., Bunka, F., & Trckova, M. (2008). Nutritional value of white lupine cultivar Butan in diets for fattening pigs. *Veterinarni Medicina*, *53*, 124-134.
- Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A.D., Chronopoulou, R., & Baldi, A. (2012). Soya protein hydrolysates modify the expression of various pro-inflammatory genes induced by fatty acids in ovine phagocytes. *The British Journal of Nutrition*, *108*, 1246-1255.

- Prasad, S., Sung, B., & Aggarwal, B.B. (2012). Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Preventive Medicine, 54*, S29-S37.
- Qayyum, M.M.N., Butt, M.S., Anjum, F.M., & Nawaz, H. (2012). Composition analysis of some selected legumes for protein isolate recovery. *The Journal of Animal & Plant Sciences, 22(4)*, 1156-1162.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62*, 597-635.
- Reche, M., Pascual, C., Fiandor, A., Polanco, I., Rivero-Urgell, M., Chifre, R., Johnston, S., & Martín-Esteban, M. (2010). The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatric Allergy and Immunology, 21*, 577-585.
- Repetto, M. (2002). Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. (3ª edición). Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .
- Reynolds, K., Chin, A., Lees, K.A., Nguyen, A., Bujnowski, D., & He, J. (2006). A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *The American Journal of Cardiology, 98*, 633-640.
- Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., & Zaloga, G.P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion, 60*, 332-337.
- Saad, B., AbouAtta, B.S., Basha, W., Hmade, A., Kmail, A. Khasib, S., & Said, O. (2011). *Hypericum triquetrifolium*—Derived factors downregulate the production levels of LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in THP-1 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-7*. DOI:10.1093/ecam/nen056.
- Salem, E.M., & Hanan, F.A. (2012). Partial substitution of eggs by lupin flour and its protein isolates in cakes manufacturing. *Journal of Applied Sciences Research, 8*, 3717-3723.

- Sánchez-Más, J., Turpín M.C., Lax, A., Ruipérez, J.A., Valdés Chávarri, M., & Pascual-Figal D.A. (2010). Efecto diferencial de espironolactona frente a eplerenona sobre el papel protector *in vitro* de testosterona en la apoptosis de cardiocitos. *Revista Española Cardiología*, *63*, 779-787.
- Sandhya, C., A. Sumantha, A., Szakacs, G., A., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, *40*, 2689-2694.
- Sanz, M.L., de las Marinas, M.D., Fernandez, J., & Gamboa, P.M. (2010). Lupin allergy: a hidden killer in the home. *Clinical & Experimental Allergy*, *40*, 1461-1466.
- Sarmadi, B.H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*, 1949-1956.
- Sawai, H., & Domae, N. (2008). Release of cytochrome c from mitochondria precedes Bax translocation/activation in Triton X-100-induced apoptosis. *Leukemia Research*, *32*, 445-453.
- Schutysse, E., Richmond, A., & Van Damme, J. (2005). Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *Journal of Leucocyte Biology*, *78*, 14-26.
- Seber, L.E., Barnett, B.W., McConnell, E.J., Hume, S.D., Cai, J., Boles, K., & Davis, K.R. (2012). Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS ONE*, *7*(4), e35409. DOI:10.1371/journal.pone.0035409.
- Sefa-Dedeh, S., & Stanley, D. (1979). Cowpea proteins 1. Use of response surface methodology in predicting cowpea (*Vigna unguiculata*) protein extractability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *27*, 1238-1243.
- Selvatici, R., Siniscalchi, A., & Spisani, S. (2013). Effects of synthetic peptides on the inflammatory response and their therapeutic potential. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*, 553-564.
- Shafie, N.H., Esa, N.M., Ithnin, H., Saad, N., & Pandurangan, A.K. (2013). Pro-apoptotic effect of rice bran inositol hexaphosphate (IP6) on HT-29 colorectal cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 23545-23558.

- Shankar, S., Rao, M., & Laxman, S.R. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*, *46*, 579-585.
- Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive Peptides: A Review. *International Journal BIOautomation*, *15*, 223-250.
- Shen, Z., Lu, M., Duan, S., & Duan, S. (2011). Macrophage polarization and inflammation at the interface of cardiovascular disease and metabolism. *North American Journal of Medicine and Science*, *4*, 191-195.
- Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, *14*, 281-286.
- Siow, H.-L., & Gan, C.-Y. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, *141*, 3435-3442.
- Sirtori, E., Resta, D., Brambilla, F., Zacherl, C., & Arnoldi, A. (2010). The effects of various processing conditions on a protein isolate from *Lupinus angustifolius*. *Food Chemistry*, *120*, 496-504.
- Smita, A., Hiroki, U., Chuanhai, Z., Lee Ann, C., Jihe, Z., Renee, C., & Jun-Lin, G. (2002). Regulation of Focal Adhesion Kinase by a Novel Protein Inhibitor FIP200. *Molecular Biology of the Cell*, *13*, 3178-3191.
- Soeda, T. (1995). Studies on the gelation of soy protein during the cold storage. Part IV. The function of food processing for the cold-gel prepared from heated soy protein isolate. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, *42*, 672-676.
- Somvanshi, R.K., Kumar, A., Kant, S., Gupta, D., Singh, S.B., Das, U., Srinivasan, A., Singh, T.P., & Dey, S. (2007). Surface plasmon resonance studies and biochemical evaluation of a potent peptide inhibitor against cyclooxygenase-2 as anti-inflammatory agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *361*, 37-42.

- Strande, J. L., & Phillips, S. A. (2009). Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *Journal of Inflammation*, 6, 4. DOI.org/10.1186/1476-9255-6-4.
- Su, Y.K., Bowers, J.A., & Zayas, J.F. (2000). Physical characteristics and microstructure of reduced-fat frankfurters as affected by salt and emulsified fats stabilized with nonmeat proteins. *Journal of Food Science*, 65, 123-128.
- Sung, B., Prasad, S., Gupta, S.C., Patchva, S., & Aggarwal, B.B. (2012). Chapter 3 – Regulation of inflammation-mediated chronic diseases by botanicals. En “Advances in Botanical Research”. (Lie-Fen, S. & Allan S.Y.L. Eds.). Elsevier.
- Świątecka, D., Świątecki, A., Kostyra, H., Marciniak-Darmochwał, K., & Kostyra, E. (2010). The impact of pea protein hydrolysates on bacterial physiological activity-An in vitro study. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 263-270.
- Tang, D., Dong, Y., Ren, H., Li, L., & He, C. (2014). A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). *Chemistry Central Journal*, 8, 4. DOI:10.1186/1752-153X-8-4.
- Tomoskozi, S., Lasztity, R., Haraszi, R., & Baticz, O. (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung* 45, 399-401.
- Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A., & Marone, G. (2006). Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1289-1300.
- Trugo, L.C., von Baer, D., & von Baer, E. (2003). Lupin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second ed., pp-3623-3629). Academic Press.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 255-261.
- Udenigwe, C.C., & Aluko, E.R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71, R11-R24.

- Vadivel, V., & Biesalski, H.K. (2012). Effect of certain indigenous processing methods on the bioactive compounds of ten different wild type legume grains. *Journal of Food Science and Technology*, *49*, 673-684.
- Van Barneveld, R.J. (1999). Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutrition Research Reviews*, *12*, 203-230.
- Van Craenenbroeck, E.M., Van Craenenbroeck, A.H., Van Ierssel, S., Bruyndonckx, L., Hoymans, V.Y., Vrints, C.J., & Conraads, V.M. (2013). Quantification of circulating CD34(+)/KDR(+)/CD45<sup>dim</sup> endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *International Journal of Cardiology*, *167*, 1688-1695.
- Vani, B., & Zayas, J.F. (1995). Wheat germ protein flour solubility and water retention. *Journal of Food Science*, *60*, 845-848.
- Van Loon, L.J., Kies, A.K., & Saris W.H. (2007). Protein and protein hydrolysates in sports nutrition. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, *17*, S1-S4.
- Varol, C., Yona, S., & Jung, S. (2009). Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunology and Cell Biology*, *87*, 30-38.
- Vernaza, M.G., Dia, V.P., Gonzalez de Mejia, E., & Chang, Y.K. (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, *134*, 2217-2225.
- Vidal, C.M.C. (2008). Alimentos funcionales. Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad, y eficacia, y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. *Humanitas*, *24*, 1-27.
- Vioque, J., Alaiz, M., & Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, *132*, 67-72.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., & Millán, F. (2001a). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, *52*, 132-136.
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *AgroCSIC*, *26*, 96-102.

- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*, 447-450.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M.M., & Millán, F. (2001b). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y aceites*, *52*(2), 127-131.
- Vo, T.-S., Ryu, B.M., & Kim, S.-K. (2013). Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1336-1346.
- Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. *Journal of Nutritional Biochemistry* (in press).
- Waggle, D.H., Steinke, F.H. & Shen, J.L. (1989). Isolated soy protein. En "Legumes. Chemistry, technology and human nutrition" (Matthews. R.H. Ed.). Marcel Dekker.
- Ward, O.P. (2011). 3.49 - Proteases. En "Comprehensive Biotechnology" (2<sup>nd</sup> edition) (Moo-Young, M. Ed.). Burlington: Academic Press.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., & Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*, 115-124.
- Weldon, S.M., Mullen, A.C., Loscher, C.E., Hurley, L.A., & Roche, H.M. (2007). Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated-human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*, 250-258.
- Wu, Y.W., & Tsai Y.H. (2006). A rapid transglutaminase assay for high-throughput screening applications. *Journal of Biomolecular Screening*, *11*, 836-843.
- Yedgar, S., Cohen, Y., & Shoseyov, D. (2006). Control of phospholipase A<sub>2</sub> activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1761*, 1373-1382.



- Yoshie-Stark, Y., & Wäsche, A. (2004). In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry*, *88*, 179-184.
- Yust, M.M., Millán-Linares, M.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F., & Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 1994-2001.
- Yust, M.M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., Millán, F., & Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, *85*, 317-320.
- Yust, M.M., Pedroche, J., Millán-Linares, M.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., & Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, *122*, 1212-1217.
- Zhang, M., Mu, T.-H., & Sun, M.-J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, *7*, 191-200.
- Zhou, B., He, Z., Yu, H., & Mukherjee, K.D. (1990). Proteins from double-zero rapeseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*, 690-694.



**ABREVIATURAS**

|                     |   |
|---------------------|---|
| <b>10-pyreno-PC</b> | 1-palmitoil-2-pirendecanoil fosfatidilcolina            |
| <b>AA</b>           | Ácido araquidónico                                      |
| <b>ACN</b>          | Acetonitrilo  |
| <b>ADP</b>          | Adenosin difosfato                                      |
| <b>AESAN</b>        | Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición   |
| <b>AT</b>           | Antitrombina  |
| <b>BAPNA</b>        | N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida |
| <b>BHA</b>          | 3- <i>tert</i> -butil-4-hidroxianisol                   |
| <b>BHT</b>          | 3, 5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxitolueno            |
| <b>BrdU</b>         | Bromodesoxiuridina                                      |
| <b>BSA</b>          | Albúmina de suero bovino                                |
| <b>CCAA</b>         | Comunidad autónoma                                      |
| <b>CCL2 (MCP-1)</b> | Quimiocina CC ligando 2                                 |
| <b>CCL18</b>        | Quimiocina CC ligando 18                                |
| <b>CCR2</b>         | Receptor de quimiocinas CC tipo 2                       |
| <b>COX</b>          | Ciclooxigenasa  |
| <b>CHROMOZYM</b>    | acetato de tosilo-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilida   |
| <b>DANSYL-CAD</b>   | monodansylcadaverina                                    |
| <b>DMSO</b>         | Dimetilsulfóxido  |
| <b>DTT</b>          | DL-ditiotreitol   |
| <b>ECA</b>          | Enzima convertidora de angiotensina                     |
| <b>EDTA</b>         | Ácido etilendiaminotetracético                          |
| <b>EFSA</b>         | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria              |
| <b>E/S</b>          | Relación enzima/sustrato                                |
| <b>FAO</b>          | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| <b>FITC</b>         | Isotiocianato de fluoresceína                           |
| <b>FCC</b>          | Food Chemicals Codex                                    |
| <b>fMPLC</b>        | Formil-metionil-leucil-fenilalanina                     |

Abreviaturas

---

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>FUFOSE</b>          | Functional Foods Science in Europe               |
| <b>GH</b>              | Grado de hidrólisis                              |
| <b>ha</b>              | Hectárea   |
| <b>HPA</b>             | Hidrolizado proteico de altramuz                 |
| <b>HPLC</b>            | Cromatografía líquida de alta resolución         |
| <b>IFN</b>             | Interferón                                       |
| <b>IL</b>              | Interleuquina                                    |
| <b>IP</b>              | Yoduro de propidio                               |
| <b>JEFCA</b>           | Joint Expert Committee on Food Aditives          |
| <b>KDa</b>             | Kilodalton                                       |
| <b>LOX</b>             | Lipooxigenasa                                    |
| <b>MES</b>             | Ácido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico              |
| <b>MTT</b>             | 1-(4, 5-Dimetiltiazol-2-il)-3, 5-difenilformazan |
| <b>NO</b>              | Óxido nítrico                                    |
| <b>OMS</b>             | Organización Mundial de la Salud                 |
| <b>PBS</b>             | Tampón fosfato salino                            |
| <b>PCR</b>             | Reacción en cadena de la polimerasa              |
| <b>P/E</b>             | Penicilina/Estreptomicina                        |
| <b>PG</b>              | Prostaglandina                                   |
| <b>pI</b>              | Punto isoeléctrico                               |
| <b>PLA<sub>2</sub></b> | Fosfolipasa A <sub>2</sub>                       |
| <b>PM1</b>             | Peso molecular > 10 kDa                          |
| <b>PM1</b>             | Peso molecular < 10 kDa                          |
| <b>PMA</b>             | 12-miristato 13-acetato de forbol                |
| <b>SD</b>              | Desviación estándar                              |
| <b>SFB</b>             | Suero Fetal Bovino                               |
| <b>t</b>               | Tonelada   |
| <b>TFA</b>             | Ácido trifluoroacético                           |
| <b>TG</b>              | Transglutaminasa                                 |
| <b>TMPD</b>            | N, N, N', N'- tetrametilfenilendiamina           |

Abreviaturas

---

|             |  |
|-------------|--|
| <b>TNBS</b> | Ácido 2, 4 ,6-trinitrobencenosulfónico |
| <b>TNF</b>  | Factor necrosis tumoral                |
| <b>TRIS</b> | Tris(hidroximetil)aminometano          |
| <b>UA</b>   | Unidades Anson                         |
| <b>UE</b>   | Unión Europea                          |
| <b>Ve</b>   | Volumen de elución                     |
| <b>Vmáx</b> | Velocidad máxima                       |



**PUBLICACIONES**



## Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway



María del Carmen Millán-Linares<sup>a</sup>, María del Mar Yust<sup>b,\*</sup>, Juan María Alcaide-Hidalgo<sup>a</sup>, Francisco Millán<sup>a</sup>, Justo Pedroche<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de la Grasa-CSIC, Av. Padre García Tejero, 4, 41012 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Química, Universidad de Sevilla, C/Prof. García González, 1, 41012 Sevilla, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 June 2013

Received in revised form 18 September 2013

Accepted 11 November 2013

Available online 19 November 2013

#### Keywords:

Lupine protein hydrolysates

Anti-inflammatory activity

Bioactive peptides

### ABSTRACT

Lupine protein hydrolysates (LPHs) were obtained from a lupine protein isolate (LPI) by enzymatic hydrolysis using two proteases, Izyme AL and Alcalase 2.4 L, and their potential anti-inflammatory capacities were studied by determining their *in vitro* inhibition of the following enzymes that are involved in the inflammatory process: phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), cyclooxygenase 2 (COX-2), thrombin, and transglutaminase (TG). The strongest inhibitory activities toward PLA<sub>2</sub> and TG were found in the hydrolysates obtained by hydrolysis with Izyme and subsequently with Alcalase, with more than 70% inhibition obtained in some cases. All of the hydrolysates tested inhibited more than 60% of the COX-2 activity. In no case did the percentage of thrombin activity inhibition exceed 40%. The best inhibitory activities were found in the LPH obtained after 15 min of hydrolysis with Alcalase and in the LPH obtained after 60 min of hydrolysis with Izyme followed by 15 min of hydrolysis with Alcalase. Enzyme kinetic analyses were conducted to determine the  $K_m$  and  $V_{max}$  parameters of these two hydrolysates using the Lineweaver–Burk equation. Both hydrolysates competitively inhibited the thrombin and PLA<sub>2</sub> activities. In the case of COX-2 and TG, the inhibition appeared to be the mixed type.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chronic inflammation is involved in the onset and development of numerous chronic diseases, such as cardiovascular diseases, cancer, diabetes, obesity, arthritis, neurological diseases, pulmonary diseases, psychological diseases and autoimmune diseases (Sung, Prasad, Gupta, Patchva, & Aggarwal, 2012). Inflammation is one of the complex biological responses of the immune system of an organism. In the initial steps, the inflammatory response is mediated by phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), which is elevated in many inflammatory disorders. PLA<sub>2</sub> hydrolyses the sn-2 ester bond of glycerophospholipids to produce free fatty acids, particularly arachidonic acid (AA), and lysophospholipids (Yedgar, Cohen, & Shoseyov, 2006). AA is metabolised mainly via the cyclo-oxygenase (COX) and lipo-oxygenase enzymatic pathways to produce diverse families of eicosanoids, including prostaglandins (PGs), thromboxanes, and leukotrienes. These eicosanoids are involved in the development of many pathological conditions, particularly inflammation-related processes (Yedgar et al., 2006).

There is a close relationship between inflammation and coagulation. Inflammation-induced coagulation is due to tissue factor,

which produces thrombin generation (Levi & van der Poll, 2005). Thrombin is a trypsin-like serine protease that has a central role in haemostasis and thrombosis. Once formed, thrombin cleaves fibrinogen to produce the fibrin mesh of the blood clot (Cirino et al., 1996). Thrombin also activates transglutaminase or factor XIII, which cross-links fibrin molecules via the formation of inter-chain  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine isopeptide bonds and stabilises the clot by preventing its hydrolysis by proteases (Moreno, 2006).

Diet is thought to be one of the major risk factors for the development of chronic diseases. Thus, modifying the diet could prevent or delay these diseases (Prasad, Sung, & Aggarwal, 2012). Some dietary agents have shown the potential to inactivate inflammatory molecules by direct binding. Recent studies have provided evidence that peptides can modify crucial regulatory functions of inflammatory processes (Fernandes, Schmidhuber, & Brain, 2009). There are many reports about synthetically derived anti-inflammatory peptides (Selvatici, Siniscalchi, & Spisani, 2013). However, few studies have examined the effect of plant protein hydrolysates on inflammatory markers. It has been reported that soybean protein hydrolysates reduce the level of some of these markers (Vernaza, Dia, González de Mejía, & Chang, 2012).

Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) is an herbaceous plant typical of the Mediterranean region. Lupine seeds can be incorporated as a protein source in both animal feed and in a variety of human foods.

\* Corresponding author. Tel.: +34 954556446.

E-mail address: [mdmar@cica.es](mailto:mdmar@cica.es) (M. d. M. Yust).



Lupine flour is rich in protein (20–40%), and this content can be increased to more than 90% in protein isolates (Lqari, Vioque, Pedroche, & Millán, 2002). Lupine protein hydrolysates (LPHs) have shown bile-acid binding activity, so these may have potential applications for reducing cholesterol in hypercholesterolemic patients (Yoshie-Stark & Wäsche, 2004). More recently, lupine proteins have been shown to exert hypotensive and hypotriglyceridemic effects *in vivo* (Cam & Gonzalez de Mejia, 2012), but there are no reports of their anti-inflammatory activity.

The objective of this work was to determine the effect of LPHs on the activity of four enzymes implicated in the inflammatory process: PLA<sub>2</sub>, COX-2, thrombin, and TG. LPHs were obtained by hydrolysis of lupine protein isolate (LPI) with Izyme and Alcalase, two food-grade proteases produced by Novozymes. Izyme has trypsin-like activity whereas Alcalase is a non-specific endoprotease. Both trypsin and Alcalase have been previously used for the generation of bioactive peptides (Korhonen & Pihlanto, 2006). Samples were collected after different periods of incubation, and the activity of the above mentioned enzymes was tested in presence of LPHs with different degrees of hydrolysis. The LPHs that exhibited a higher inhibitory activity were selected, and their enzyme kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) were determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The *L. angustifolius* seeds were provided by Koipesol Semillas, S.A. (Seville, Spain). Izyme AL (564 EU/ml) and Alcalase 2.4 L (2.4 AU/g) were provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). PLA<sub>2</sub> from bovine pancreas, albumin (human, essentially fatty acid-free), thrombin from bovine plasma, antithrombin III (AT III), tosyl-gly-pro-arg-p-nitroanilide acetate salt (Chromozym), heparin sodium salt, protamine sulphate salt from salmon, TG from guinea pig liver, monodansylcadaverine (dansyl-CAD), dextran-coated charcoal, DL-dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol, cystamine dihydrochloride, COX-2 human, AA from porcine liver, N,N,N',N'-tetramethyl *p*-phenylenediamine (TMPD), flunixin meglumine, and hematin (porcine) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl phosphatidylcholine (10-pyrene-PC) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Bovine milk casein was obtained from Calbiochem (Merck Group, Darmstadt, Germany). Iodoacetamide was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Obtaining the lupine protein isolate

The LPI was obtained using the method of Lqari et al. (2002). Briefly, defatted lupine flour was extracted with 0.25% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (w/v) at pH 10.5, for 1 h. After centrifuging the extract at 7500 rpm for 15 min, the supernatant was recovered, and the pellet was extracted again. Both of the supernatants were adjusted to the isoelectric point of lupine proteins (pH 4.3). The resulting precipitate was washed with distilled water adjusted to pH 4.3 and centrifuged to remove residual salts and other non-protein compounds. Finally, the precipitated proteins were lyophilised and stored at room temperature.

#### 2.2.2. Hydrolysis of the lupine protein isolate

Hydrolysis was conducted in a bioreactor under stirring at a controlled pH and temperature. The LPI was suspended in distilled water (10% w/v), and two types of hydrolysis were performed: one with Izyme followed by Alcalase and one using only Alcalase. The following conditions were used.

Hydrolysis with Izyme and Alcalase: First, the LPI was hydrolysed with Izyme for 1 h at pH 10, 50 °C, and E/S = 100 EU/g protein. Then, a second hydrolysis with Alcalase at pH 8, 50 °C, and E/S = 0.3 AU/g protein was conducted for 1 h.

Hydrolysis with Alcalase: The LPI was hydrolysed with Alcalase for 1 h at pH 8, 50 °C, and E/S = 0.3 AU/g protein.

Samples were taken at different times, and enzymes were inactivated by heating at 85 °C for 15 min. The supernatants obtained from centrifugation at 8000 rpm for 15 min constituted the LPHs. The LPHs obtained using Izyme followed by Alcalase were designated 0I, 15I, 30I, 60I, 60I + 15A, 60I + 30A, and 60I + 60A. The LPHs obtained using Alcalase were designated 0A, 5A, 10A, 15A, 20A, 25A, 30A, and 60A. The number indicates the time of hydrolysis in minutes.

#### 2.2.3. Determination of the degree of hydrolysis (DH)

The DH, defined as the percentage of peptide bonds cleaved, was determined by the TNBS method according to Adler-Nissen (1979). The total number of amino groups was determined in a sample that had been 100% hydrolysed at 110 °C for 24 h in 6 N HCl.

#### 2.2.4. Determination of protein and peptide content

The protein concentrations were determined by elemental microanalysis as % nitrogen content × 6.25 using a Leco CHNS-932 analyser (St. Joseph, MI, USA).

#### 2.2.5. PLA<sub>2</sub> activity assay

The PLA<sub>2</sub> activity was evaluated *in vitro* by measuring the fluorescence produced by its hydrolysis of the 10-pyrene-PC substrate (Cunningham, Maciejewski, & Yao, 2006). PLA<sub>2</sub> was dissolved in a solution of 50 mM Tris, 0.1 M NaCl, and 2 mM CaCl<sub>2</sub> with 0.25% fatty acid-free albumin (pH 7.4) added to a final concentration of 0.5 mg/ml. The substrate (supplied in chloroform) was dried under a nitrogen stream, dissolved in absolute ethanol, and stored at –20 °C prior to use. A 5 μM solution of substrate was prepared in the same buffer used for the enzyme, but without albumin. The fluorescence at 355 nm excitation/420 nm emission was measured using a fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The reactions were evaluated for 60 min at 25 °C. The concentration of the LPHs was 0.6 mg/ml. A negative control without LPHs and a positive control (0.6 mg/ml flunixin meglumine in the well) were used.

#### 2.2.6. COX-2 activity assay

The COX-2 activity was determined according to the method described by Somvanshi et al. (2007) with some modifications. An aliquot of 0.35 μl of commercial COX-2 was incubated with 5 μl of LPHs (at 70 μg protein/μl), and 95 μl of 100 mM Tris, 1 mM EDTA, and 2 μM hematin pH 8.3 for 1 h at room temperature. The reaction was initiated by adding 50 μl of 1.6 mM arachidonic acid and 50 μl of 0.8 mM TMPD dissolved in the same buffer, but without hematin and preincubated for 30 min at room temperature. A control without LPHs and a positive control (1.24 mg/ml flunixin meglumine in the well) were used. TMPD oxidation was determined spectrophotometrically by the absorbance at 610 nm using a Multiskan Spectrum microplate reader (Thermo Labsystem). The initial rate of the reaction was measured during the first 21 s, and the percentage inhibition was calculated.

#### 2.2.7. Thrombin activity assay

The thrombin activity was determined by following the increase in the absorbance at 405 nm that accompanies hydrolysis of the chromogenic substrate Chromozym (Ialenti et al., 2001). Fifty microlitres of LPH (at 70 μg protein/μl) was preincubated for 1 h with 5 μl of enzyme (0.136 μg/ml), at room temperature.

Then, the mixture was resuspended in 1.45 ml of 50 mM Tris and 150 mM NaCl pH 8.3. The reaction was initiated by adding 0.5 ml of 0.3 mM substrate. The absorbance at 405 nm was measured for 5 min in a Du 640 spectrophotometer (Beckman Coulter). Heparin and AT III were used as the positive control. AT III is a glycoprotein that inactivates several enzymes involved in clotting. The affinity of AT III for thrombin is enhanced by the action of heparin. For this reason, 30  $\mu$ l of AT III (4.04  $\mu$ g/ml) and 15  $\mu$ l of heparin (3.74 g/ml) were incubated for 1 h at room temperature. This mixture was suspended in 1.455 ml of assay buffer and preincubated for 1 h with 5  $\mu$ l of enzyme (0.136  $\mu$ g/ml) at room temperature. Afterwards, 0.5 ml of 0.3 mM substrate was added, and the absorbance was measured. A negative control lacking LPHs was used.

### 2.2.8. Transglutaminase activity assay

The method described by Wu and Tsai (2006) was used with some modifications. This method is based on the TG-catalysed incorporation of the fluorescent substrate dansyl-CAD into casein and the subsequent separation of the unreacted fluorescent molecules. The lyophilised enzyme (4.1 U/mg protein) was dissolved in water to a final concentration of 1 mg/ml, and 100  $\mu$ l aliquots were stored in vials at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Three microlitres of enzyme was added to 3  $\mu$ l of each LPH sample (70  $\mu$ g protein/ $\mu$ l) and 24  $\mu$ l of 10 mM Tris buffer pH 7.5, 1 mM EDTA, and 0.025% (v/v) 2-mercaptoethanol in the wells of a fluorescence microplate that was incubated at room temperature for 60 min. Then, 30  $\mu$ l of 100 mM Tris pH 9, 10 mM DTT, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg/ml casein and 100  $\mu$ M dansyl-CAD was added and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The reaction was stopped by adding 60  $\mu$ l of 2 mM iodoacetamide (prepared fresh) for a 2 min incubation on ice. Then, 150  $\mu$ l of dextran-coated charcoal at 10 mg/ml was added. The microplate was centrifuged in an Allegra X-22 R centrifuge model (Beckman Coulter) at 1000 rpm for 15 min to pellet the unreacted dansyl-CAD. The supernatants (100  $\mu$ l) were carefully withdrawn, and the fluorescence intensity was measured in a microplate reader at excitation and emission wavelengths of 340 and 535 nm, respectively. The enzyme activity was expressed as the net fluorescence per well, which reflects the amount of product formed in the reaction. A control without an inhibitor and a positive control with 0.54 mg/ml cystamine dihydrochloride were used.

### 2.2.9. Determination of the kinetic constants

The Michaelis constants ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) in the presence of the most effective LPHs were calculated for each enzyme by performing activity assays with different substrate concentrations and using Lineweaver–Burk equations.

### 2.2.10. Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent determinations. The statistical analysis was performed with OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA)). The data was analysed using a one-way ANOVA, followed by Holm–Bonferroni tests for multiple comparisons. Differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Study of the degree of hydrolysis

LPI was hydrolysed using two food-grade commercial enzymes, Izyme and Alcalase. Hydrolysis with Izyme resulted in a DH of approximately 9% (Fig. 1A); the DH was not increased by increasing the time of hydrolysis or the enzyme/substrate ratio, which may be due, partially, to the lysine-plus-arginine content of the LPI (15%,

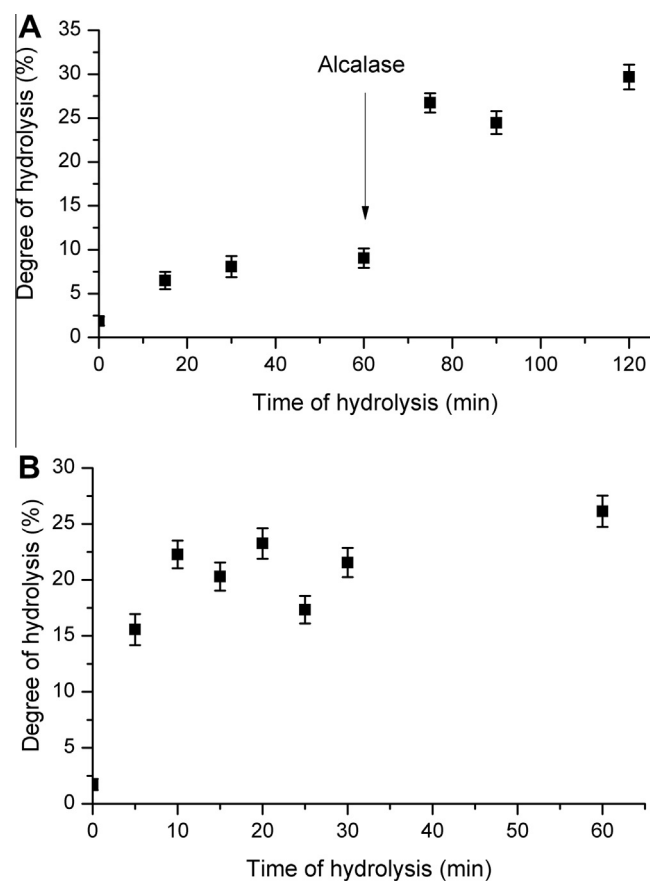


Fig. 1. Time-course of hydrolysis of LPI by Izyme and Alcalase (A) and Alcalase (B).

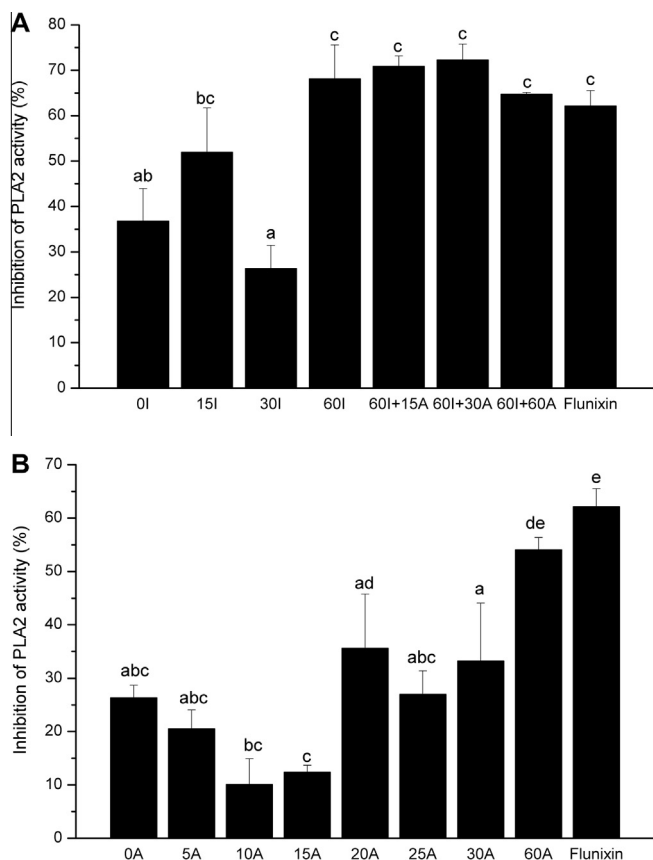
data not shown). Analysis of the results, showed that Izyme performance was approximately 60%. Because most bioactive peptides known at present contain 2–20 amino acids and have molecular masses of less than 6000 Da (Sarmadi & Ismail, 2010), a second hydrolysis using Alcalase was performed after hydrolysis with Izyme. In this way, the DH was rapidly increased up to 30%.

The rate of hydrolysis of the LPI using only Alcalase was rapid during the first 10 min and then remained almost stable for the following 50 min, reaching a maximum DH of 26% (Fig. 1B). A high reaction rate has also been observed for the hydrolysis of other plant proteins using Alcalase (Yust, Millán-Linares, Alcaide-Hidalgo, Millán, & Pedroche, 2012).

### 3.2. Inhibition of enzymes involved in the inflammatory pathway

#### 3.2.1. Inhibition of $\text{PLA}_2$ activity

$\text{PLA}_2$  enzymes are low molecular weight proteins that catalyse hydrolysis at the sn-2 position of membrane phospholipids, releasing unsaturated fatty acids and liberating AA, a precursor of eicosanoids, including prostaglandins and leukotrienes. These enzymes have been implicated in diverse physiological processes, including asthma, inflammation, carcinogenesis, haemostasis, parturition, maintenance of renal function, pain and fever; indeed, these enzymes are detected in the serum and biological fluids of patients with various inflammatory, autoimmune and allergic disorders (Triggiani, Granata, Frattini, & Marone, 2006). In recent investigations, plant proteins have been shown to act as antioxidants, inhibiting lipid peroxidation, and as anti-inflammatory agents due to their ability to inhibit  $\text{PLA}_2$ . One example is turmerin, a protein from *Curcuma longa* L. (Chethankumar, 2010).

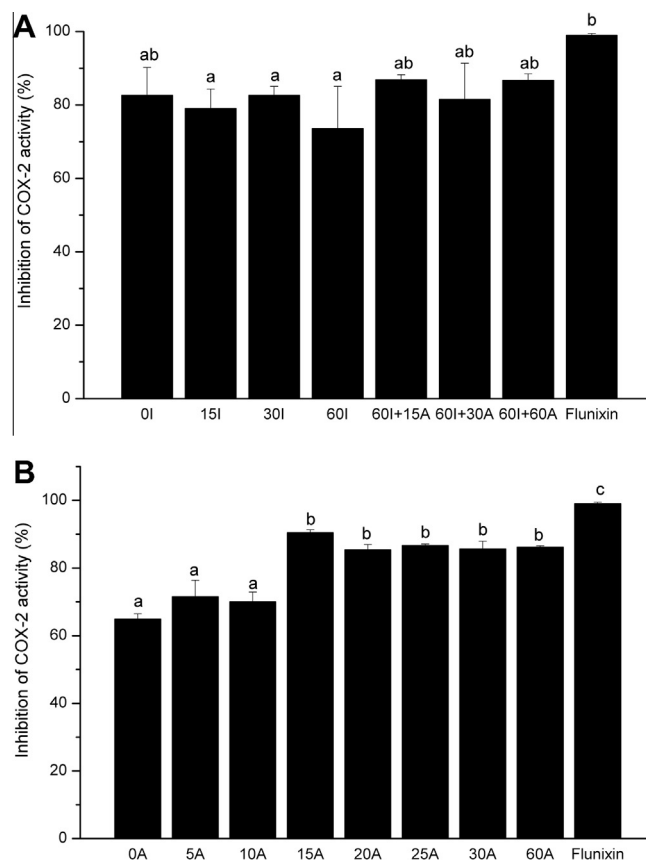


**Fig. 2.** Inhibition of PLA<sub>2</sub> activity by LPHs obtained using Izyme followed by Alcalase (A) and using Alcalase (B). Values marked with different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Hydrolysis of LPI with Izyme for 60 min increased inhibition of PLA<sub>2</sub> activity up to 68% (Fig. 2A). This value is similar to that showed by the positive control, flunixin. A second step of hydrolysis with Alcalase did not increase or decrease inhibition of PLA<sub>2</sub>, which may be attributed to the destruction of inhibitory peptides and the generation of new ones throughout the hydrolytic process. Likewise, the hydrolysis with Alcalase produces smaller peptides which may be more easily absorbed from the gastrointestinal tract. Regarding LPHs obtained using Alcalase, only LPH 60A showed higher PLA<sub>2</sub> inhibition than 0A (Fig. 2B). However, the achieved inhibition was lower than the obtained when LPI was hydrolysed with Izyme and Alcalase.

### 3.2.2. Inhibition of COX-2 activity

COX catalyses the addition of two moles of molecular oxygen to arachidonic acid, forming prostaglandin G<sub>2</sub> and converting G<sub>2</sub> to PGH<sub>2</sub>. Hence, COX performs the critical initial reaction that leads to the formation of pro-inflammatory prostaglandins, thromboxanes and prostacyclins. COX exists in two isoforms, COX-1 and COX-2. COX-1 is considered a constitutive enzyme, whereas COX-2 is an inducible enzyme whose expression occurs in inflammatory cell types and tissues (Gierse, Koboldt, Walker, Seibert, & Isakson, 1999). COX-2 mediates prostaglandin synthesis (PGE<sub>2</sub>), which in turn promotes cell proliferation and cytokine secretion and suppresses immune surveillance by mechanisms such as the inhibition of Th1 activation and IL-2 secretion and the suppression of dendritic cells via IL-10. The COX-2 pathway was shown to participate in cases of inflammatory diseases, such as Crohn's disease, and in colon carcinoma (Kanterman, Sade-Feldman, & Baniyash, 2012).

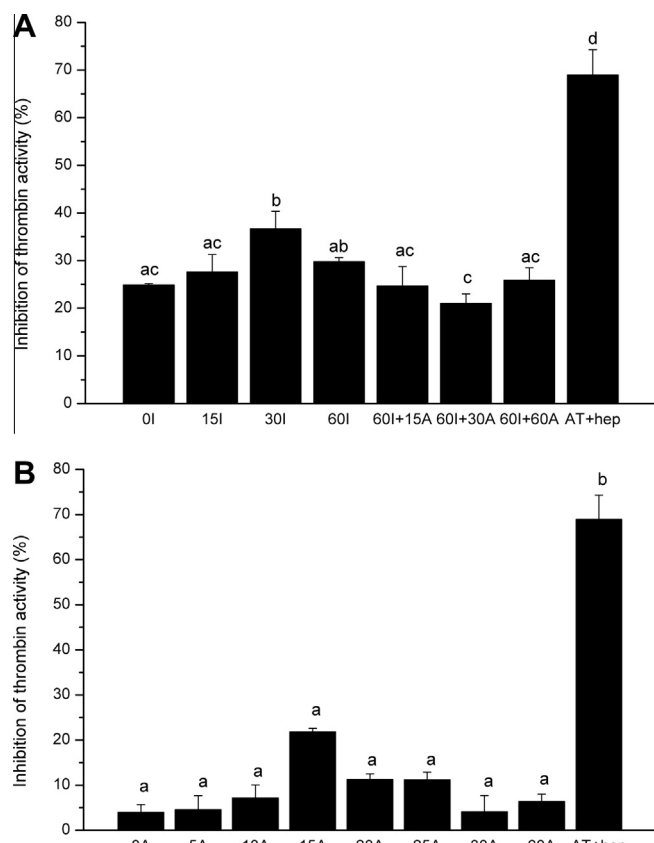


**Fig. 3.** Inhibition of COX-2 activity by LPHs obtained using Izyme followed by Alcalase (A) and using Alcalase (B). Values marked with different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

It should be noted that untreated lupine proteins highly inhibited COX-2 activity (Fig. 3). The differences between the inhibitory activities of OI and 0A may be due to the effect of the different pH (10 and 8, respectively), which may alter the structure of the proteins. Hydrolysis of the LPI with Izyme followed by Alcalase did not improve its ability to inhibit COX-2, showing all LPHs tested more than 70% of COX-2 inhibition (Fig. 3A). When the LPI was hydrolysed using only Alcalase, the highest inhibitory activity was observed in the hydrolysate obtained after 15 min of treatment (90%) (Fig. 3B). The inhibition values are remarkable when compared with that of the reference inhibitor, flunixin, which inhibited 98% of COX-2 activity at a concentration slightly less than that of the LPHs (1.24 mg/ml versus 1.75 mg/ml). Moreover, the LPHs are peptide mixtures and only some of the peptides may inhibit COX-2; therefore, purification may result in substances with higher inhibitory activities (Li, Zhou, Huang, Sun, & Zeng, 2012).

### 3.2.3. Inhibition of thrombin activity

Thrombin acts in the coagulation cascade by catalysing the conversion of fibrinogen into fibrin and, consequently, achieving the formation of a blood clot. Furthermore, thrombin has been found to exert a number of pro-inflammatory and mitogenic effects and has been linked to the development of vascular disease (Morris, Winyard, Blake, & Morris, 1994). Specifically, thrombin stimulates the production of proinflammatory cytokines and interleukins, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6, and the production of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) by vascular endothelial cells (Strande & Phillips, 2009). Hydrolysing the lupine proteins with Izyme for 30 min increased their thrombin inhibition by up to 36% (Fig. 4A). When the time of hydrolysis, and therefore the DH, was



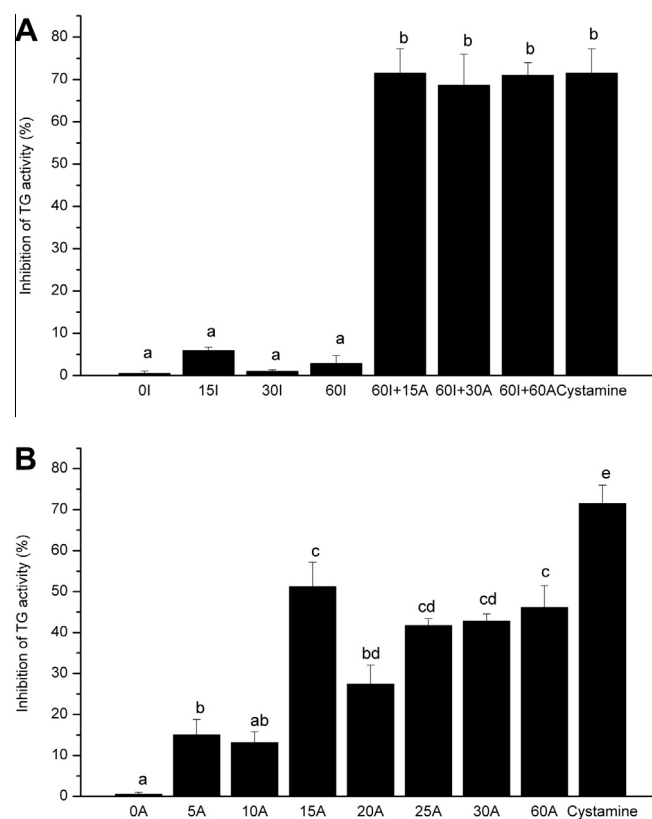
**Fig. 4.** Inhibition of thrombin activity by LPHs obtained using Izyme followed by Alcalase (A) and using Alcalase (B). Values marked with different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

increased, the thrombin inhibitory activity was reduced to the initial values. When the LPI was hydrolysed only with Alcalase, the highest inhibitory activity was observed after 15 min of treatment. As in the hydrolytic process with Izyme plus Alcalase, there was not a direct correlation between the increase of the DH and the inhibition of thrombin activity (Fig. 4B). Those results may be due to the destruction of the potentially anti-inflammatory peptides generated initially and the production of new ones in such a way that the thrombin inhibition by LPHs did not depend on the DH but on the generation of specific peptides. These results are similar to those regarding the hypocholesterolaemic and anti-oxidant effects reported by Yust et al. (2012).

### 3.2.4. Inhibition of TG activity

TG is a calcium-dependent enzyme that catalyses the covalent crosslinking of the  $\gamma$ -carboxamide groups of peptides bound to glutamine residues with the  $\epsilon$ -amino groups of peptides bound to lysine residues. In addition, the involvement of TG-2 in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, such as liver cirrhosis, lung fibrosis, and rheumatoid arthritis, has been suggested (Kumar & Mehta, 2013). Moreno (2006) reported that short peptides, termed antinflammins, have anti-inflammatory effects due, at least in part, to their ability to inhibit TG-2.

The rates of TG inhibition by the LPHs obtained with Izyme and Alcalase and with Alcalase are shown in Fig. 5A and B, respectively. The LPHs prepared using Izyme had little effect on the activity of TG, but the addition of a second round of hydrolysis using Alcalase led to 70% inhibition of TG. This result was similar to that of positive control, cystamine, a neuroprotectant used in a number of disease models whose therapeutic benefit has been attributed to its



**Fig. 5.** Inhibition of transglutaminase activity by LPHs obtained using Izyme followed by Alcalase (A) and using Alcalase (B). Values marked with different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

inhibition of the TGs and caspase 3 (Jeitner, Delikatny, Ahlqvist, Capper, & Cooper, 2005), except that the concentration of cystamine used was 130 times less than that of the LPHs. The highest TG inhibition achieved by the LPHs obtained with Alcalase was 51%, which was observed in LPH 15A.

### 3.3. Determination of kinetic parameters

Considering the observed inhibition of the four enzymes under investigation, two LPHs, 60I + 15A and 15A, were selected, and kinetics studies were performed to determine their  $K_m$  and  $V_{max}$  values using the Lineweaver–Burk equation.

#### 3.3.1. Kinetic parameters of PLA<sub>2</sub> inhibition

The kinetic analysis revealed that the  $K_m$  values for PLA<sub>2</sub> inhibition were 3.25  $\mu$ M for LPH 60I + 15A and 1.36  $\mu$ M for LPH 15A when the inverse of the reaction velocity ( $\mu$ mol/min) and the substrate concentration ( $\mu$ M) (from the Lineweaver–Burk equation) were considered (Table 1). Both of the LPHs seemed to competitively inhibit PLA<sub>2</sub> activity because the  $V_{max}$  remained almost constant whereas the ratio  $V_{max}/K_m$  decreased (in the case of 60 + 15A). In the case of LPH 15A, the ratio  $V_{max}/K_m$  did not decrease, but the  $K_m$  value of LPH 15A was larger than that of the control; therefore, its inhibition also appears to be the competitive type.

#### 3.3.2. Kinetic parameters of COX-2 inhibition

COX-2 exhibited a  $K_m$  of 5.15  $\mu$ M in the kinetic assay without an inhibitor. When LPHs 60I + 15A or 15A were added to the reaction medium, the  $K_m$  value was 17.5 or 15.7  $\mu$ M, respectively (Table 1). Additionally, the  $V_{max}/K_m$  ratio was lower in both cases, indicating

**Table 1**Values of  $V_{\max}$  and the ratios  $V_{\max}/K_m$  for controls and inhibitors obtained from Lineweaver–Burk equation for different enzymes.

| Enzyme    | PLA <sub>2</sub> |                | COX-2      |                | Thrombin   |                | TG-2       |                |
|-----------|------------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|
|           | $V_{\max}$       | $V_{\max}/K_m$ | $V_{\max}$ | $V_{\max}/K_m$ | $V_{\max}$ | $V_{\max}/K_m$ | $V_{\max}$ | $V_{\max}/K_m$ |
| Control   | 1.01             | 0.83           | 15.6       | 3.04           | 17.9       | 1.09           | 7288       | 578.0          |
| 60I + 15A | 1.16             | 0.36           | 11.7       | 0.67           | 17.5       | 0.75           | 5072       | 377.4          |
| 15A       | 0.97             | 0.71           | 11.1       | 0.70           | 19.3       | 0.59           | 5871       | 403.2          |

 $V_{\max}$  is expressed in  $\mu\text{mol}/\text{min}$  $K_m$  is expressed in  $\mu\text{M}$ .

that the inhibition of COX-2 by the LPHs was not competitive or uncompetitive, but a mixed (non-competitive) inhibition.

### 3.3.3. Kinetic parameters of thrombin inhibition

As shown in Table 1, the  $K_m$  of thrombin inhibition was 23.2  $\mu\text{M}$  for LPH 60I + 15A and 32.6  $\mu\text{M}$  for LPH 15A when the inverse of the reaction velocity ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) and the substrate concentration ( $\mu\text{M}^{-1}$ ) (from the Lineweaver–Burk equation) was considered. Both LPHs seemed to competitively inhibit thrombin because the  $V_{\max}$  remained almost constant, whereas the  $V_{\max}/K_m$  ratio decreased.

### 3.3.4. Kinetic parameters of TG inhibition

The kinetic parameters of TG inhibition were estimated using Lineweaver–Burk plots; the  $K_m$  value estimated for dansyl-CAD in this study was 12.6  $\mu\text{M}$ , which was similar to the results obtained by Lorand, Lockridge, Campbell, Myhrman, and Bruner-Lorand (1971), who reported  $K_m = 14 \mu\text{M}$  with  $\alpha$ -casein as an acceptor. For the hydrolysates,  $K_m$  13.4  $\mu\text{M}$  was obtained in the case of the hydrolysate 60I + 15A and 14.6  $\mu\text{M}$  was obtained for the 15A hydrolysate. Therefore, the inhibition appears to be of the mixed type because the  $V_{\max}$  and the  $V_{\max}/K_m$  ratio decreased.

## 4. Conclusion

Hydrolysates of a lupine protein isolate obtained using commercial proteases inhibited the activity of some of the enzymes involved in the inflammatory pathway. Chronic inflammation is associated with the development of several chronic diseases. Therefore, the results of this study indicate the potential use of lupine protein hydrolysates in the production of functional foods. Additionally, the addition of lupine protein hydrolysates, as ingredients, may improve the nutritional value of a product. However, further studies should be performed to elucidate the anti-inflammatory effects of lupine hydrolysates *in vivo*.

## Acknowledgements

This work was supported by the Grant AGL2012-40247-C02-01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

## References

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256–1262.
- Cam, A., & Gonzalez de Mejia, E. (2012). Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 53–66.
- Chethankumar, M. (2010). Turmerin, a protein from *Curcuma longa* L. prevent oxidative organ damage against *Naja naja* venom phospholipase A2 in experimental animal. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3, 29–34.
- Cirino, G., Cicala, C., Bucci, M. R., Sorrentino, L., Maraganore, J. M., & Stone, S. R. (1996). Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 821–827.
- Cunningham, T. J., Maciejewski, J., & Yao, L. (2006). Inhibition of secreted phospholipase A2 by neuron survival and anti-inflammatory peptide CHEC-9. *Journal of Neuroinflammation*, 3, 25. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-3-25>.
- Fernandes, E., Schmidhuber, S. M., & Brain, S. D. (2009). Sensory-nerve-derived neuropeptides: Possible therapeutic targets. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 194, 393–416.
- Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K., & Isakson, P. C. (1999). Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochemical Journal*, 339, 607–614.
- Ialenti, A., Santagada, V., Caliendo, G., Severino, B., Fiorino, F., Maffia, P., et al. (2001). Synthesis of novel anti-inflammatory peptides derived from the amino-acid sequence of the bioactive protein SV-IV. *European Journal of Biochemistry*, 268, 3399–3406.
- Jeitner, T. M., Delikatny, E. J., Ahlqvist, J., Capper, H., & Cooper, A. J. L. (2005). Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochemical Pharmacology*, 69, 961–970.
- Kanterman, J., Sade-Feldman, M., & Baniyash, M. (2012). New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in Cancer Biology*, 22, 307–318.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Kumar, S., & Mehta, K. (2013). Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: How intimate is the relationship? *Amino acids*, 44, 81–88.
- Levi, M., & van der Poll, T. (2005). Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15, 254–259.
- Li, Y., Zhou, J., Huang, K., Sun, Y., & Zeng, X. (2012). Purification of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1320–1325.
- Lorand, L., Lockridge, O. M., Campbell, L. K., Myhrman, R., & Bruner-Lorand, J. (1971). A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma. *Analytical Biochemistry*, 44, 221–231.
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Millán, F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chemistry*, 76, 349–356.
- Moreno, J. J. (2006). Effects of anti-inflammatories on transglutaminase and phospholipase A<sub>2</sub> activation by transglutaminase. *International Immunopharmacology*, 6, 300–303.
- Morris, R., Winyard, P. G., Blake, D. R., & Morris, C. J. (1994). Thrombin in inflammation and healing: Relevance to rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53, 72–79.
- Prasad, S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2012). Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Preventive Medicine*, 54, S29–S37.
- Selvatichi, R., Siniscalchi, A., & Spisani, S. (2013). Effects of synthetic peptides on the inflammatory response and their therapeutic potential. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 553–564.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
- Somvanshi, R. K., Kumar, A., Kant, S., Gupta, D., Singh, S. B., Das, U., et al. (2007). Surface plasmon resonance studies and biochemical evaluation of a potent peptide inhibitor against cyclooxygenase-2 as an anti-inflammatory agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 37–42.
- Strande, J. L., & Phillips, S. A. (2009). Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells *in vitro*. *Journal of Inflammation*, 6, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-6-4>.
- Sung, B., Prasad, S., Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2012). Regulation of inflammation-mediated chronic diseases by botanicals. *Advances in Botanical Research*, 62, 57–132.
- Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A., & Marone, G. (2006). Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1289–1300.
- Vernaza, M. G., Dia, V. P., González de Mejía, E., & Chang, Y. K. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134, 2217–2225.
- Wu, Y. W., & Tsai, Y. H. (2006). A rapid transglutaminase assay for high-throughput screening applications. *Journal of Biomolecular Screening*, 11, 836–843.

- Yedgar, S., Cohen, Y., & Shoseyov, D. (2006). Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1373–1382.
- Yoshie-Stark, Y., & Wäsche, A. (2004). *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry*, 88, 179–184.
- Yust, M. M., Millán-Linares, M. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., & Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1994–2001.

Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

# Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages

M<sup>a</sup> del Carmen Millán-Linares<sup>a</sup>, Beatriz Bermúdez<sup>a</sup>,  
María del Mar Yust<sup>b,\*</sup>, Francisco Millán<sup>a</sup>, Justo Pedroche<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de la Grasa (CSIC), Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Prof. García González 1, 41012 Sevilla, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 November 2013

Received in revised form 21 March 2014

Accepted 24 March 2014

Available online

### Keywords:

Anti-inflammatory activity

Bioactive peptides

Lupine protein hydrolysates

Macrophage polarization

## ABSTRACT

The effect of two different lupine protein hydrolysates (LPHs) on *in vitro* macrophage activation in a THP-1-derived macrophage model was investigated. THP-1-derived macrophages were exposed to RPMI medium containing two LPHs obtained by enzymatic hydrolysis using two different proteases: Izyme AL and Alcalase 2.4 L. Cytokine's expression was measured by quantitative PCR. THP-1-derived macrophages exhibited attenuated expression of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF), IL-6, IL-1 $\beta$ ) and increased expression of anti-inflammatory marker genes (chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18)) relative to control without LPH. The anti-inflammatory effect of both hydrolysates favored M2 polarization by quenching C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) expression and migratory capacity. Furthermore, LPHs significantly decreased nitric oxide production. Moreover, LPHs promoted the survival of human THP-1-derived macrophages. Therefore, inclusion of LPHs in foods may help to prevent chronic diseases associated with chronic inflammation.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

## 1. Introduction

The consumption of dietary protein drives many fundamental metabolic processes and is particularly important in nutrient-based biological functions (Gersh, Sliwa, Mayosi, & Yusuf, 2010). In addition to providing essential amino acids to various systemic modulatory pathways, proteins and peptides produced by the hydrolysis of food proteins may also elicit potent anticancer, antimicrobial, hypocholesterolemic, antihypertensive, antithrombotic, and anti-inflammatory effects (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008). Bioactive pep-

tides can be cleaved from polypeptide chains through gastrointestinal digestion, by fermentation or ripening during food processing, and by controlled hydrolytic processes using exogenous proteases (Pedroche et al., 2007). Many of these biologically active peptides are derived from both plant and animal sources, with most potentially stemming from milk-based products and legumes, such as soybean. Many reports have shown the potential health benefits of enzymatic hydrolysates prepared from milk, egg, and soy proteins (Möller et al., 2008; Shahidi & Zhong, 2008). Much research has focused on hydrolysates with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities whereas other bioactive properties such as

\* Corresponding author. Tel.: +34 954611550; fax: +34 954616790.

E-mail address: [mdmar@cica.es](mailto:mdmar@cica.es) (M. del Mar Yust).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.020>

1756-4646/© 2014 Published by Elsevier Ltd.

anti-inflammatory effect are less studied. In fact, very few studies report anti-inflammatory properties of protein hydrolysates (Vo, Ryu, & Kim, 2013; Xu, Yang, Yin, Liu, & Mine, 2012). Regarding the bioactive properties of lupine, it was previously reported that protein extracts from white lupine can lower plasma cholesterol (Weiße et al., 2010) and triacylglycerol concentrations (Spielmann et al., 2007) in hypercholesterolemic animal models. Furthermore, lupine has shown anti-atherogenic effects in laboratory animals due to its lipid-lowering properties. In this study, Marchesi et al. (2008) demonstrated that a protein isolate from lupine reduces focal plaque development in the common carotid arteries in a rabbit model of atherosclerosis. However, no information has been reported about the anti-inflammatory properties of lupine proteins and peptides.

Inflammation is an important normal immune response during lesions and infections. However, an excessive inflammation can contribute to several acute and chronic diseases characterized by uncontrolled production of pro-inflammatory cytokines, eicosanoids derived from arachidonic acid, reactive oxygen species (ROS) and adhesion molecules (Calder, 2006). Therefore, inhibitors of the pro-inflammatory cytokines have been considered as a candidate of anti-inflammatory drugs. Chronic inflammation is a hallmark of several pathologies, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, atherosclerosis and cancer. The macrophage is the key player of the chronic inflammatory response, which the monocytic cell line THP-1 represents an appropriate model system to study immune responses (Weldon, Mullen, Loscher, Hurley, & Roche, 2007). It is well known that macrophages are key players during inflammatory responses and their phenotype determines the cytokine secretion profile. Thus, classically activated M1 macrophages contribute to the development and enhancement of inflammatory and immunity processes and are, therefore, associated with high microbicidal activity, supporting the activity of Th1 cells (Mills, Kincaid, Alt, Heilman, & Hill, 2000). This type of activation is associated with an elevated production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), IL-6, and IL-1; ROS; and nitrogen intermediates (Cathcart, 2004). Alternative macrophage activation (M2) is triggered in response to IL-4 or IL-13 and is associated with tissue remodeling and immunoregulation (Gordon & Martinez, 2010). M2 macrophages produce anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18), and IL-1 receptor antagonist. Due to their anti-inflammatory profile, M2 macrophages are frequently associated with all types of activation triggered by anti-inflammatory stimuli.

The increase in the incidence of inflammation related disorders has led to the search of proteins and peptides with anti-inflammatory properties (Ndiaye, Vuong, Duarte, Aluko, & Matar, 2012). There is evidence of the ability of distinct food compounds, including proteins, to modulate inflammation in experimental models involving macrophages (Boesch-Saadatmandi et al., 2011; Hämäläinen et al., 2011; Yu, Correll, & Vanden Heuvel, 2002). Indeed some peptides with anti-inflammatory activity have been purified from plants (Dia, Wang, Oh, de Lumen, & Gonzalez de Mejia, 2009).

In a previous paper, we have described that blue lupine protein hydrolysates (LPHs) inhibited some enzymes involved in the inflammatory pathway, such as phospholipase

A2 and cyclooxygenase-2 (Millán-Linares, Yust, Alcaide-Hidalgo, Millán, & Pedroche, 2014). In this work, we investigated the potential anti-inflammatory activity of two lupine protein hydrolysates (LPHs) in a THP-1-derived macrophage model. LPHs were obtained by hydrolysis of lupine protein isolate (LPI) with Izyme AL and Alcalase 2.4 L, two food-grade proteases produced by Novozymes. Izyme AL has trypsin-like activity whereas Alcalase is a non-specific endoprotease. Both trypsin and Alcalase have previously been used for the generation of bioactive peptides (Korhonen & Pihlanto, 2006).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

LPI was prepared according to Yust, Pedroche, Millán-Linares, Alcaide-Hidalgo, and Millán (2010). Izyme AL and Alcalase 2.4 L were provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). The cell type used was THP-1 monocytes, ATCC® Number TIB-202™. The medium for this line was Gibco® RPMI 1640 (Life Technologies SA, Alcobendas, Spain). PBS, fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin (P/S) solution were obtained from Gibco® as well. Dimethyl sulfoxide (DMSO), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), trypan blue solution, and 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-naphthylethylenediamine-HCl) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ribonuclease A was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The iScript cDNA Synthesis Kit was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The Annexin V-FITC Kit was obtained from Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix was purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Primers were purchased from Eurofins Biolab S.L.U. (Barcelona, Spain). NucleoSpin RNA II was obtained from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany). Human TNF and IL-10 ELISA Sets were from Bionova Científica (Madrid, Spain).

### 2.2. Preparation of LPHs

Hydrolysis was performed in a bioreactor while stirring at a controlled pH and temperature. LPI was suspended in distilled water (10% w/v), and two types of hydrolysis were performed: one with Izyme AL followed by Alcalase and one using only Alcalase. The following conditions were used.

Hydrolysis with Izyme AL and Alcalase: First, LPI was hydrolyzed with Izyme AL for 1 h at pH 10, 50 °C, E/S = 100 EU/g protein. A second step of hydrolysis with Alcalase at pH 8, 50 °C, E/S = 0.3 AU/g protein, was then performed for 15 min.

Hydrolysis with Alcalase: pH 8, 50 °C, E/S = 0.3 AU/g protein, and duration of hydrolysis of 15 min.

Enzymes were inactivated by heating at 85 °C for 15 min, centrifuged at 8000 rpm for 15 min, and the supernatants constituted LPHs. LPH obtained with Izyme AL followed by Alcalase was designated I + 15A, and LPH obtained using only Alcalase was designated 15A.



### 2.3. Cell culture and treatments

The human monocytic THP-1 cell line was cultured in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 1% P/S and 10% heat-inactivated FBS. To induce monocyte-macrophage differentiation, THP-1 cells were cultured in the presence of PMA (100 nmol/L) for 4 days (Weldon et al., 2007). PMA-stimulated THP-1 cells (referred to as THP-1-derived macrophages) were exposed to RPMI medium (supplemented with 1% FBS) for 24 h and then treated with the LPH I + 15A or the LPH 15A at a concentration of 500 µg/mL RPMI medium (1% FBS) for 6 h.

### 2.4. Measurement of cell proliferation by the MTT method

THP-1-derived macrophage proliferation was evaluated by measuring optical density at different concentrations of treatments in a 96-well plate. Cells were incubated at 37 °C with the LPH I + 15A or the LPH 15A at final concentrations of 100, 300, 500, 700, or 2000 µg/mL for 18 h. An aliquot of 20 µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37 °C for 6 h. MTT is reduced to purple formazan in living cells (Carmicheal, DeGraff, Gazdar, Minna, & Mitchell, 1987). The supernatant was removed, and 200 µL of DMSO was added to each well to dissolve the insoluble purple formazan product into a colored solution, followed by shaking for 10 min. Absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader, and cell proliferation was calculated. RPMI medium (1% FBS) was used as control.

### 2.5. Analysis of cellular DNA content

Cellular DNA content was assessed by propidium iodide (PI) staining and FACS analysis as previously described, with modifications (Mills et al., 2000). The cells were exposed to RPMI medium (1% FBS) containing the LPH I + 15A or the LPH 15A at a concentration of 500 µg/mL for 24 h of treatment. The cells were then fixed in 1% paraformaldehyde in PBS containing 0.5% saponin for 5 min at 4 °C. After centrifugation, the cells were incubated in buffer containing 5 µg/mL PI and 1 mg/mL ribonuclease A for 10 min at 4 °C. The cells were analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer and BD FACSCanto II Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). FBS 1% and FBS 10% were used as negative and positive controls, respectively. Cells that were hypodiploid due to DNA fragmentation were regarded as apoptotic cells.

### 2.6. Cell viability

Cells were exposed to the LPH I + 15A or the LPH 15A at 100, 300, 500, 700, 1000, or 2000 µg/mL for 24 h, rinsed with PBS, and evaluated for live/dead cells using the trypan blue exclusion test. Viable cells excluded the dye, whereas dead cells were stained an intense blue. At least 200 cells were scored to assess live/dead cells. The number of viable cells was quantified by confocal microscopy (Olympus IX81, Tokyo, Japan). RPMI medium (1% FBS) was used as control. Cells were tested in triplicate, and the results were averaged.

### 2.7. Measurement of apoptotic cells

Early events associated with apoptosis were evaluated using the binding of annexin V to detect the translocation of

phosphatidylserine from the inner side to the outer leaflet of the plasma membrane of apoptotic cells and using PI to detect the DNA of necrotic cells, as described in the Annexin V-FITC Kit. An analysis of stained cells was performed by measuring fluorescence emission using a BD FACSCanto II flow cytometer at 530 and 585 nm for fluorescein isothiocyanate and PI, respectively, and using BD FACSCanto II Software. RPMI medium (1% FBS) was used as control and staurosporine (pro-apoptotic) as positive control.

### 2.8. mRNA extraction and analysis of PCR products

Total RNA was extracted from the THP-1-derived macrophages using NucleoSpin® RNA II. RNA quality was assessed using the OD260:OD280 ratio determined by a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). One microgram of total RNA was subjected to RT-PCR to obtain cDNA according to the manufacturer's protocol.

The mRNA levels for specific genes were determined using an Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For each QPCR, 10 ng of cDNA template was added to Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix containing primer pairs for TNF, IL-6, IL-1β, CCL18, C-C chemokine receptor type 2 (CCR2), and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2). The reference genes HPRT and GAPDH were used to correct for RNA concentration differences between the samples.

The sequence of and information about the primers that were used in this study are as follows: TNF (NM\_000594.3): 5'-TCCTTCAGACACCTCAACC-3' and 5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCIT-3' (reverse); IL-6 (NM\_001001928): 5'-GTTTGAGGGGTAACAGCAA-3' and 5'-GCTAACTGCAGAGGGTGAGG-3'; IL-1β (NM\_138712): 5'-GCTGTGCAGGAGATCACAGA-3' and 5'-GGGCTCCATAAAGTCACCAA-3'; CCL18 (NM\_002957): 5'-GGGTTTCTTCCCTTTCGAG-3' and 5'-GCGTGTTCCTTTCCACAAT-3'; IL-10 (NM\_000572.2): 5'-GTTCTTTGGGGAGCCAACAG-3' and 5'-GCTCCCTGGTTTCTCTTCT-3'; CCR2 (NM\_001002): 5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3' and 5'-ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3'; CCL2 (NM\_002982.3): 5'-CCCCAGTCACCTGCTGTAT-3' and 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'; HPRT (NM\_000194.2): 5'-ACCCACGAAGTGTGGATA-3' and 5'-AAGCAGATGGCCACAGAAT-3'; and GAPDH (NM\_002046.4): 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' and 5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3'.

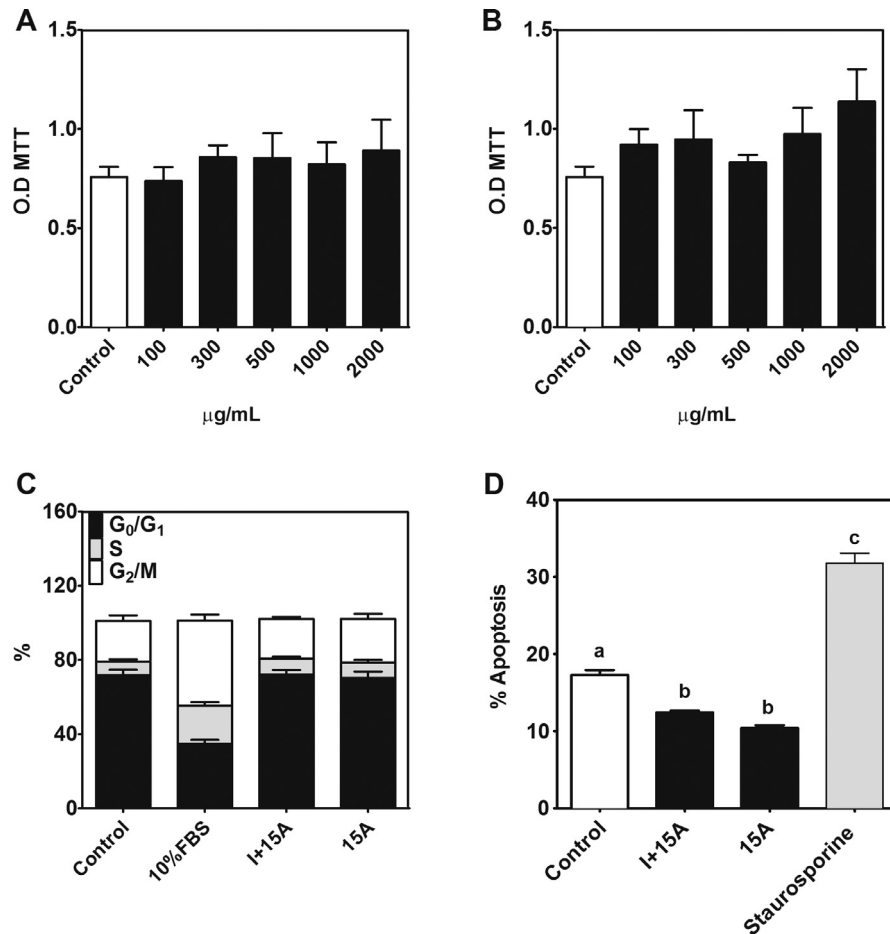
All amplification reactions were performed in triplicate. The magnitude of the change in mRNA expression for the candidate genes was calculated using the standard  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method. All data were normalized to endogenous reference genes (HPRT and GAPDH) levels and expressed as a percentage of the control.

### 2.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

TNF and IL-10 concentrations in cell culture supernatants were quantified by commercial ELISA kits according to manufacturer's instructions.

### 2.10. Measurements of nitrite in THP-1-derived macrophages cells

As an indicator of NO production, nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) concentration was measured in the cell culture supernatants. Equal volumes of culture supernatants and Griess reagent were mixed and the absorbance was read at 540 nm in the microplate reader



**Fig. 1** – Effect of LPHs (500–2000 µg/mL) I + 15A (A) and 15A (B) on cell proliferation of human THP-1-derived macrophages determined by MTT assay after 24 h. Study of the DNA distribution in the cell cycle (% G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, % S and % G<sub>2</sub>/M) in THP-1-derived macrophages treated with LPH I + 15A or LPH 15A (C). Percentage of apoptotic cell death in THP-1-derived macrophages after exposure to LPHs at 500 µg/mL for 24 h (D). Values marked with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(Green et al., 1981). The amount of nitrite was obtained by an extrapolation from a standard curve with sodium nitrite.

### 2.11. Migration assays

THP-1-derived macrophages were collected in RPMI-1640 medium containing 10% FBS, and 1% P/S and seeded in 24-well culture plates at  $5 \times 10^5$  per well to allow high-density adhesion of the macrophages. After removing the floating cells, the adherent cells were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h to form a confluent monolayer. The macrophage monolayer was wounded by scratching with a thin pipette tip. The cells were treated with each LPH (I + 15A and 15A) and allowed to migrate for 24 h. The migration of THP-1-derived macrophages was examined and quantified by confocal microscopy. Images were captured at the beginning and at 24 h of cell migration to close the wound and compared to quantify the migration rates of the cells.

### 2.12. Statistical analysis

The data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent determinations. Group-wise statistical comparisons were

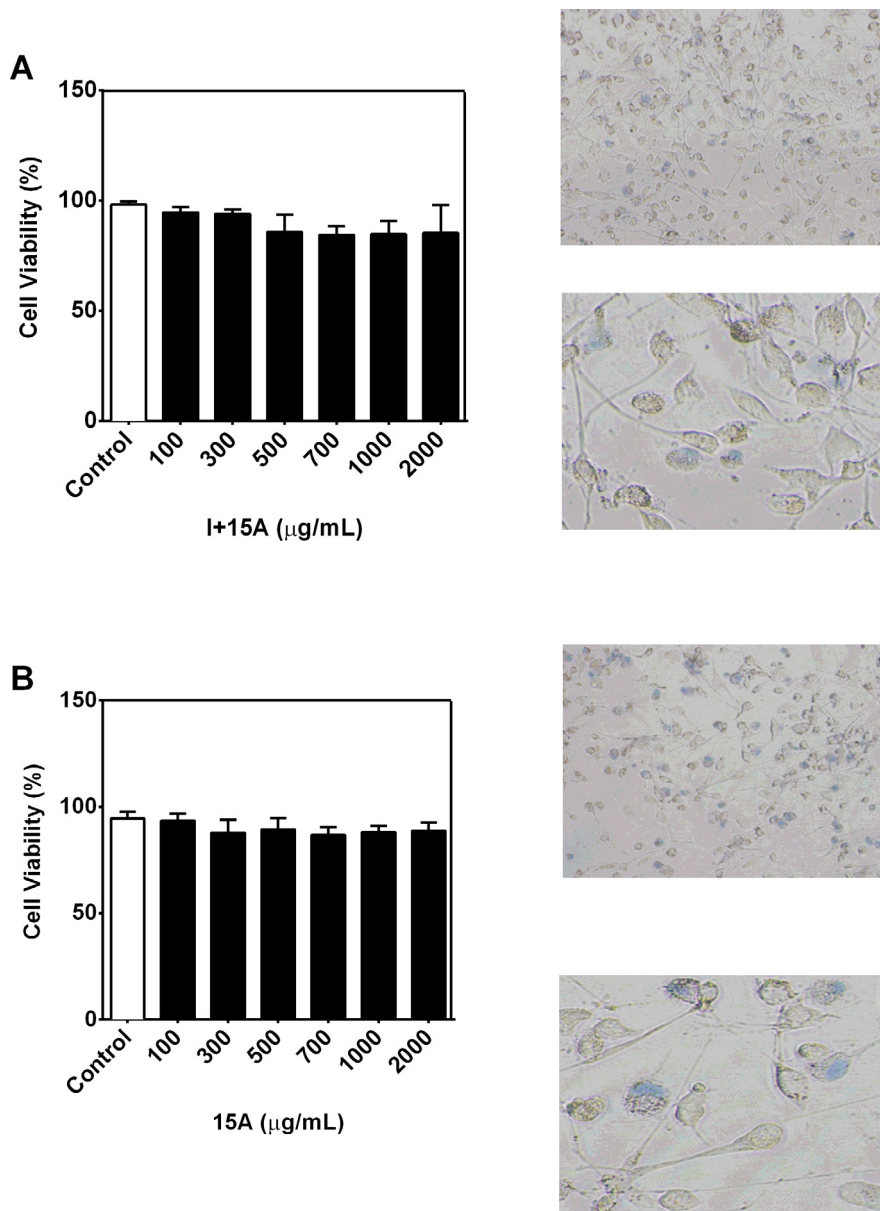
performed by a one-way ANOVA with a *post hoc* Bonferroni test. Differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. LPHs do not alter the cellular integrity of THP-1-derived macrophages

Before assessing the anti-inflammatory activity, cell viability and the potential cytotoxicity of the LPHs were evaluated (Gülden & Seibert, 2003).

To investigate whether LPHs may cause a cytotoxic effect, an MTT assay was performed on THP-1-derived macrophages after separately adding each LPHs at increasing concentrations to conditioned RPMI culture medium for 24 h. The LPHs I + 15A and 15A had no significant effects (Figs. 1A, B) compared with the untreated control group. Moreover, using flow cytometric analysis to study the DNA distribution in the cell cycle (Sawai & Domae, 2008), we observed that the percentage of S population among THP-1-derived macrophages treated with the LPH I + 15A or the LPH 15A was slightly increased



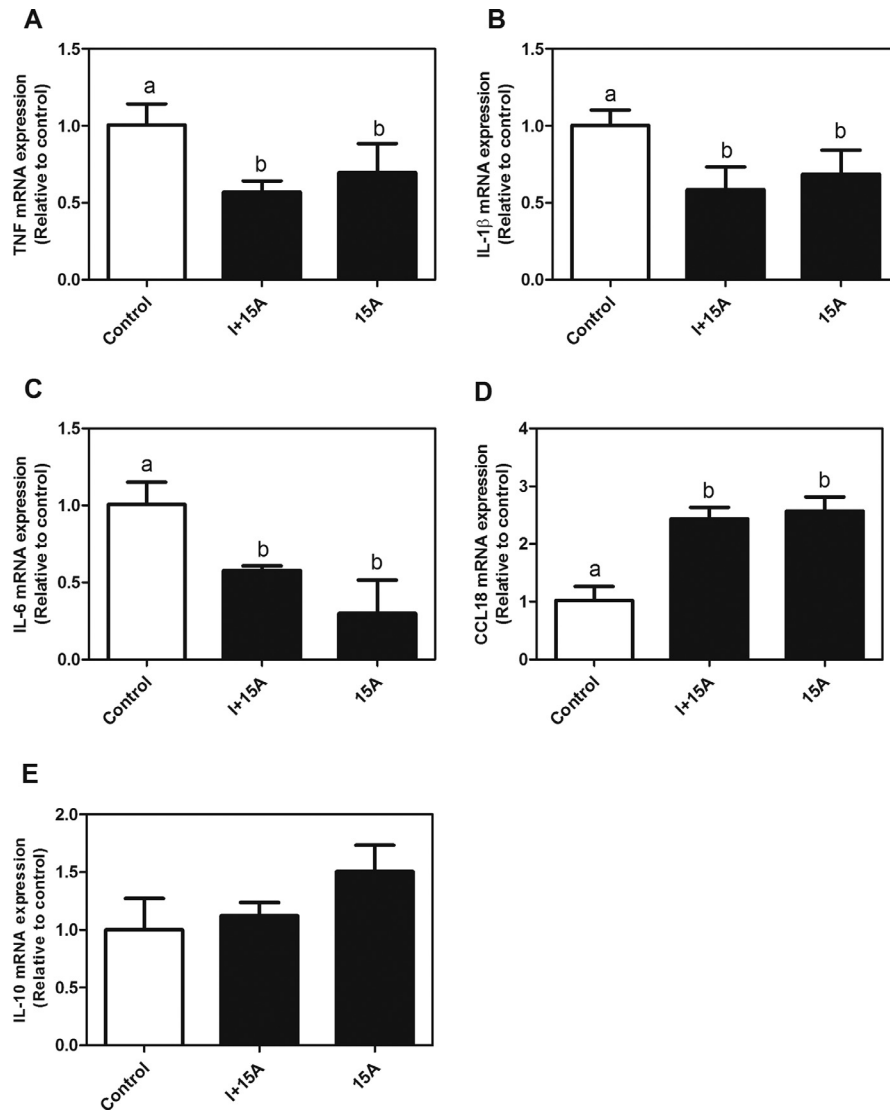
**Fig. 2** – Cell viability (%), determined by trypan blue exclusion assay, in the presence of LPHs I + 15A (A) and 15A (B), after 24 h of treatment and different concentrations (100–2000 μg/mL). Some images obtained with confocal microscopy are presented.

(Fig. 1C), but did not reach significance. For the quiescent phase ( $G_0/G_1$ ) and  $G_2/M$  population no differences were found in relation to the control (1% FBS). For all samples, even though a degree of proliferative activity, which was not significant, was observed, the cells remained in the quiescent phase for a longer period. The addition of 10% FBS was used as a positive control.

The contribution of LPHs to the activation of programmed cell death (apoptosis) was also investigated. Interestingly, apoptosis was reduced in the presence of the LPH I + 15A or the LPH 15A (29 and 35%, respectively) compared with the control (Fig. 1D). This effect seems to endow both LPHs with a protective effect against apoptosis. To complete the feasibility

studies of the LPHs, cell viability was assayed by trypan blue exclusion in THP-1-derived macrophages treated with increasing concentrations of the LPH I + 15A or the LPH 15A for 24 h. As expected, there was no differences in cell viability after 24 h of incubation in the presence of higher concentrations of the LPH I + 15A, which ranged from 100 to 2000 μg/mL, when compared with the control (Fig. 2A). The same pattern was observed after treatment with the LPH 15A (Fig. 2B).

Taken together, these results suggest that in general, LPHs do not compromise the integrity of THP-1-derived macrophages. Although cell viability was decreased upon exposure to higher concentrations, this decrease did not reach 30% cell loss for either of the LPHs tested. Hence, LPHs did not have



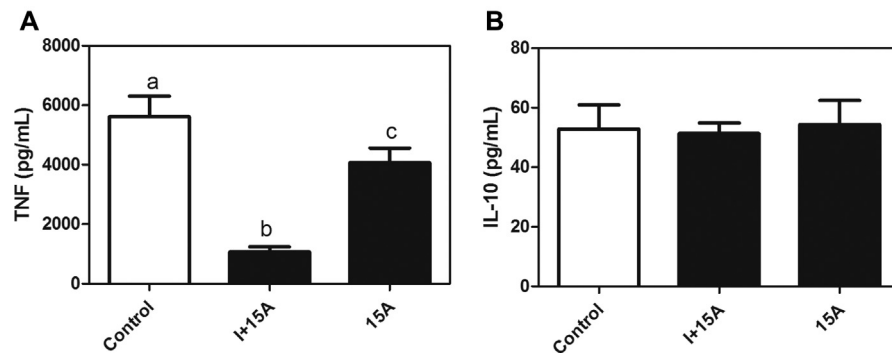
**Fig. 3** – TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), CCL18 (D), and IL-10 (E) mRNA expression in THP-1-derived macrophages after 6 h of treatment with LPHs (I + 15A, and 15A). Values marked with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

any major effect on membrane integrity in the selected cell model.

### 3.2. Effect of LPHs on the expression of pro and anti-inflammatory cytokines

Several diseases, such as obesity-associated insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome, are sustained by chronic subclinical inflammation (Faloia et al., 2012). Elevated levels of cytokines, such as leptin, TNF, IL-1, and IL-6, are generally increased during inflammatory diseases (Hajer, Van Haefen, & Visseren, 2008). A growing body of evidence has shown that biologically active peptides derived from plants can prevent many inflammatory disorders due to the peptides' antioxidant and anti-inflammatory effects (Politis, Theodorou, Lampidonis, Chronopoulou, & Baldi, 2012; Vernaza, Día, Gonz alez de Mejía, & Chang, 2012). Classically activated macrophages (with an M1 phenotype) mediate tissue damage and

initiate inflammatory responses by releasing pro-inflammatory mediators (Olefsky & Glass, 2010). These mediators recruit additional macrophages, establishing a feed-forward process that further increases leukocytes content and propagates the chronic inflammatory state (Shen, Lu, Duan, & Duan, 2011). Herein, we first evaluated the ability of LPHs (I + 15A and 15A) to modulate the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 $\beta$ , and IL-6 in THP-1-derived macrophages (Fig. 3A–C). TNF showed significant inhibition after 6 h of incubation with either hydrolysate. This reduction was markedly pronounced after I + 15A treatment (TNF: –45%, IL-1: –32%, and IL-6: –43%). The LPH 15A induced the downregulation of TNF and IL-1 in activated macrophages by 30 and 35%, respectively, whereas IL-6 levels were blunted (70%). No significant differences were observed between the treatments. These results indicate that LPHs tend to decrease the pro-inflammatory capacity of activated M1 macrophages by diminishing cytokines expression, setting a trend of regulation of the inflammatory process. Macro-



**Fig. 4** – Effect on TNF (A) and IL-10 (B) production of THP-1-derived macrophages after 48 h of treatment with LPHs (I + 15A, and 15A). Values marked with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

phage polarization dramatically alters the immune properties of these cells, as evidenced by the potent anti-microbial properties of M1 macrophages compared with the prominent anti-inflammatory tissue repair properties of M2 macrophages (Joshi et al., 2010). Depending on the cytokine microenvironment, the M2 macrophage phenotype is characterized by the expression of cell surface proteins such as CD206 and CD163 and of soluble factors such as CCL18 (Bellón et al., 2011). To corroborate the hypothesis that LPHs have potential anti-inflammatory role, the expressions of CCL18 and IL10 (M2 markers) after 6 h of incubation with the LPHs 15A or the LPH I + 15A were evaluated. Surprisingly, both LPHs highly increased CCL18 expression, doubling the value compared with the control (Fig. 3D). However, no significant differences were observed in the IL-10 expression in THP-1-derived macrophages after treatment with LPHs (Fig. 3E).

Taken together, these data suggest that the LPHs I + 15A and 15A may have a beneficial capability to skew activated M1 macrophages toward the anti-inflammatory M2 phenotype.

### 3.3. Effect of LPHs on cytokines production

To corroborate the effect of LPHs on cytokines mRNA expression, the concentration of TNF and IL-10 was measured in cell culture supernatants. The production of TNF was decreased by both LPHs (Fig. 4A). This inhibition was higher in LPH I + 15A, which inhibited more than 80% TNF production. Regarding IL-10, significant differences were not observed among LPHs and control (Fig. 4B). These data coincided with the ones obtained by quantitative PCR, where THP-1-derived macrophages exhibited attenuated expression of proinflammatory cytokine TNF, and showed no significant differences in the expression of IL-10.

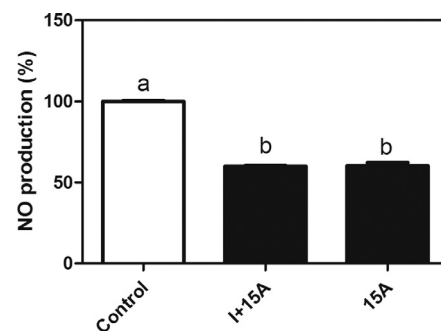
### 3.4. Effect of LPHs on the nitrite production

Nitric oxide (NO) has been shown to play a central role in inflammatory and immune reaction activities and macrophages appear to be the main cellular source of NO (Montserrat-de la Paz, Fernández-Arche, Ángel-Martín, & García-Giménez, 2012). The effect of LPHs on the release of this inflammatory mediator is depicted in Fig. 5. Both LPHs inhibited approximately 50% of NO production. Other legume protein

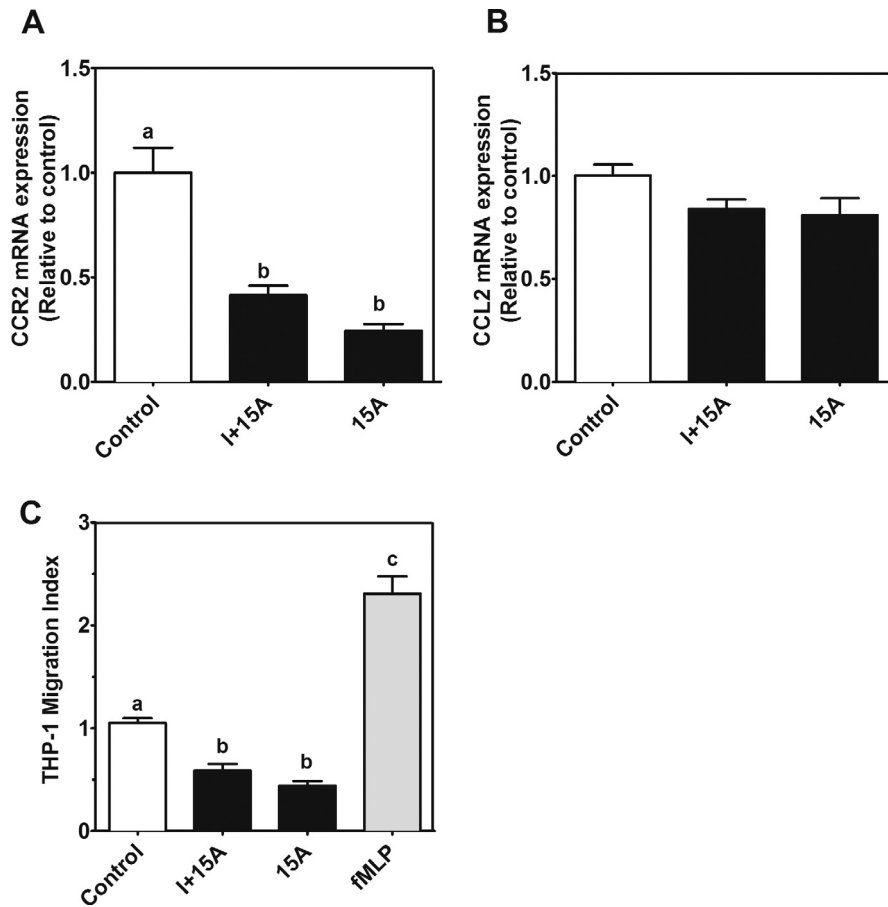
hydrolysates have shown inhibition of NO production by activated macrophages (Ndiaye et al., 2012).

### 3.5. LPHs impair the chemotactic capacity of human THP-1-derived macrophages

Previously, Fontanari, Batistuti, da Cruz, Hilario, and Saldiva (2012) investigated the potential hypolipidemic effect of a total protein extract from *Lupinus albus*, which is associated with a mechanism shared with soya proteins (Duranti et al., 2004; Lovati et al., 2000; Lovati, Manzoni, Gianazza, & Sirtori, 1998). Furthermore, soy-based diets have been shown to reduce atherosclerotic lesions through downregulation of the expression levels of monocyte chemokines essential for the initiating events in atherosclerosis, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) or CCL2. CCL2 has a systemic role in the regulation of metabolism, and particularly in controlling leukocyte extravasation and chemotaxis toward inflamed tissues. For instance, Weisberg et al. (2006) reported a significant reduction in plaque macrophage content in mice lacking CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup> mice). Furthermore, certain evidence has indicated an increase in M1 and decrease in M2 macrophages in obese adipose tissue (Lumeng, Bodzin, & Saltiel, 2007). Interestingly, such a phenotypic switch was not observed in CCR2<sup>-/-</sup> mice, suggesting that the MCP-1/CCR2 pathway could contribute to M2 macrophage polarization.



**Fig. 5** – NO production (%) in THP-1-derived macrophages after 48 h of treatment with LPHs (I + 15A, and 15A). Values marked with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 6** – CCR2 (A) and CCL2 (B) mRNA expression in THP-1-derived macrophages after 6 h of treatment with LPHs (I + 15A, and 15A). Migration index (C) of THP-1-derived macrophage after 24 h of incubation. Values marked with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

We hypothesized that as occurs with soy proteins, lupine hydrolysates may exert a beneficial effect on the chemotaxis mechanism by modulating the CCR2/CCL2 axis. To examine this issue, the expression of CCR2 and CCL2 in human THP-1-derived macrophages was evaluated after 6 h of incubation with either LPH. As expected, the CCL2/CCR2 axis was noticeably modulated by both LPHs. **Figure 6A** shows a dramatic reduction in CCR2 expression by the LPH I + 15A (–62%), whereas this expression was more blunted by the LPH 15A (–84%). Despite the significant reduction in CCR2, we could not find any significant difference in the expression of its ligand, CCL2 (**Fig. 6B**), but did note a decreasing tendency. Accordingly, the migration index was reduced after 24 h of treatment with the LPH I + 15A (–44%) or the LPH 15A (–58%). A potent chemotactic agent, fMLP, was used as positive control (**Fig. 6C**).

Thus far, the results indicate that the addition of LPHs to fully differentiated THP-1 macrophages results in the decreased expression of both CCR2 and CCL2 and, consequently, a decrease in the cells' migration capability. These findings suggest that infiltrating activated macrophages exposed to LPHs may lose their chemotactic ability, which ameliorates the inflammatory state.

In conclusion, after LPH treatment, THP-1-derived-macrophages showed attenuated expression of TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  (proinflammatory cytokines) and increased expression of CCL18 (anti-inflammatory). Moreover, NO production was inhibited. Thereby, LPHs displayed hyporeactivity to M1-type ligands and polarization to the M2 phenotype. Furthermore, our data demonstrate that both LPHs attenuate the macrophage migratory response, which is partly mediated by skewing THP-1-derived macrophages toward alternatively activated M2 macrophages, which are equipped for repair and resolution of the inflammatory response. Thus, this study is the first to describe the anti-inflammatory effect of LPHs in THP-1-derived macrophages and the influence in the control of macrophage polarization in the context of inflammatory state.

### Acknowledgments

This work was supported by the grant AGL2012–40247–C02–01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. We thank Prof. F.J.G. Muriana for his critical reading of this manuscript.

## REFERENCES

- Bellón, T., Martínez, V., Lucendo, B., del Peso, G., Castro, M. J., Aroeira, L. S., & Bajo, M. A. (2011). Alternative activation of macrophages in human peritoneum: Implications for peritoneal fibrosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26, 2995–3005.
- Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A. E., Stachurska, A., Jozkowics, A., Dulak, J., & Rimbach, G. (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: Role of miR-155. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 293–299.
- Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1505S–1519S.
- Carmicheal, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47, 936–942.
- Cathcart, M. K. (2004). Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocyte/macrophage: Contributions to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 23–28.
- Dia, V. P., Wang, W., Oh, V. L., de Lumen, B. O., & Gonzalez de Mejia, E. (2009). Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 114, 105–108.
- Duranti, M., Lovati, M. R., Dani, V., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Castiglioni, S., & Morazzoni, P. (2004). The  $\alpha'$  subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver  $\beta$ -VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *The Journal of Nutrition*, 134, 1334–1339.
- Faloia, E., Michetti, G., De Robertis, M., Luconi, M. P., Furlani, G., & Boscaro, M. (2012). Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, doi:10.1155/2012/476380.
- Fontanari, G. G., Batistuti, J. P., da Cruz, R. J., Hilario, P., & Saldiva, P. H. N. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, 132, 1521–1526.
- Gersh, B. J., Sliwa, K., Mayosi, B. M., & Yusuf, S. (2010). Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: Global implications. *European Heart Journal*, 31, 642–648.
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*, 32, 593–604.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1981). Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
- Gülden, M., & Seibert, H. (2003). In vitro-in vivo extrapolation: Estimation of human serum concentrations of chemicals equivalent to cytotoxic concentrations in vitro. *Toxicology*, 189, 211–222.
- Hajer, G. R., Van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29, 2959–2971.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Asmawi, M. Z., Vuorela, P., Vapaatalo, H., & Molainen, E. (2011). Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. *Planta Medica*, 77, 1504–1511.
- Joshi, A. D., Oak, S. R., Hartigan, A. J., Finn, W. G., Kunkel, S. L., Duffy, K. E., & Hogaboam, C. M. (2010). Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunology*, 11, 52.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., Arnoldi, A., Kurowska, E., Carroll, K. K., & Sirtori, C. R. (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *The Journal of Nutrition*, 130, 2543–2549.
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., & Sirtori, C. R. (1998). Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active  $\beta$ -conglycinin subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2474–2480.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 175–184.
- Marchesi, M., Parolini, C., Diani, E., Rigamonti, E., Cornelli, L., Arnoldi, A., & Chiesa, G. (2008). Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *The British Journal of Nutrition*, 4, 1–4.
- Millán-Linares, M. C., Yust, M. M., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., & Pedroche, J. (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chemistry*, 151, 141–147.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164, 6166–6173.
- Montserrat-de la Paz, S., Fernández-Arche, M. A., Ángel-Martín, M., & García-Giménez, M. D. (2012). The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19, 1072–1076.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171–182.
- Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R. E., & Matar, C. (2012). Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *European Journal of Nutrition*, 51, 29–37.
- Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*, 72, 219–246.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2007). Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Research International*, 40, 931–938.
- Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A. D., Chronopoulou, R., & Baldi, A. (2012). Soya protein hydrolysates modify the expression of various pro-inflammatory genes induced by fatty acids in ovine phagocytes. *The British Journal of Nutrition*, 108, 1246–1255.
- Sawai, H., & Domae, N. (2008). Release of cytochrome c from mitochondria precedes Bax translocation/activation in Triton X-100-induced apoptosis. *Leukemia Research*, 32, 445–453.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914–931.
- Shen, Z., Lu, M., Duan, S., & Duan, S. (2011). Macrophage polarization and inflammation at the interface of cardiovascular disease and metabolism. *North American Journal of Medicinal Sciences*, 4, 191–195.
- Spielmann, J., Shukla, A., Brandsch, C., Hirsche, F., Stangl, G. I., & Eder, K. (2007). Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulation element-binding protein-1c. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51, 387–392.
- Vernaza, M. G., DÍa, V. P., González de Mejía, E., & Chang, Y. K. (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of

- germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134, 2217–2225.
- Vo, T.-S., Ryu, B., & Kim, S.-K. (2013). Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysates of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1336–1346.
- Weiß, K., Brandsch, C., Zernsdorf, B., Nkengfack Nembongwe, G. S., Hofmann, K., Eder, K., & Stangl, G. I. (2010). Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol: HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. *European Journal of Nutrition*, 49, 65–71.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., & Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 115–124.
- Weldon, S. M., Mullen, A. C., Loscher, C. E., Hurley, L. A., & Roche, H. M. (2007). Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 250–258.
- Xu, C., Yang, C., Yin, Y., Liu, J., & Mine, Y. (2012). Phosphopeptides (PPPs) from hen egg yolk phosvitin exert anti-inflammatory activity via modulation of cytokine expression. *Journal of Functional Foods*, 4, 718–726.
- Yu, Y., Correll, P. H., & Vanden Heuvel, J. P. (2002). Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: Evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1581, 89–99.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Millán-Linares, M. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., & Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilized Alcalase. *Food Chemistry*, 122, 1212–1217.