

tenciales biomarcadores de cada especie animal. El presente trabajo se ha centrado en la selección de un péptido biomarcador para detectar la presencia de pollo en mezclas de carne. Como criterios de selección se tuvo en cuenta que el péptido elegido fuera específico de la especie aviar, así como que su detección fuera posible aun en aquellos casos en los que la carne de pollo esté presente en bajas cantidades en el producto. De este modo, se llevó a cabo el protocolo de trabajo de la Figura 1 empleando una mezcla de carne conteniendo un 1% de pollo en carne de cerdo. Después de realizar la hidrólisis con tripsina de las fracciones OFFGEL 3 y 4 (Figura 2), el análisis mediante LC-ESI-MS/MS de los péptidos generados permitió la identificación del péptido biomarcador e específico de la especie aviar ³⁷ALGQNPTNAEINK⁴⁹ procedente de MLC3. La cuantificación de este péptido en mezclas de carne conteniendo distintos porcentajes de carne de pollo (0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 %) se realizó mediante la adición de su homólogo marcado con isótopos

estables (+7 Da) al extracto enriquecido en MLC3 después del fraccionamiento en OFFGEL (Figura 1). De este modo se obtuvo una buena correlación lineal ($R^2 = 0,9921$) entre el porcentaje de carne de pollo añadido a la mezcla y la cantidad del péptido biomarcador seleccionado, determinada por LC-ESI-MS/MS. El método desarrollado en el presente trabajo es preciso y sensible, además de ser fiable en el análisis de alimentos sometidos a un tratamiento térmico elevado. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la aproximación proteómica puede ser una alternativa de interés a los métodos empleados actualmente para resolver el problema de la determinación de las especies cárnicas.

Referencias

- [1] Woolfe M, Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 2004; 22 (5): 222-6.

Péptidos inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I generados en la digestión *in vitro* de la carne de cerdo

Elizabeth Escudero¹, Miguel Angel Sentandreu¹, Keizo Arihara², Fidel Toldrá¹

¹Instituto de agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). ²Faculty of Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University

Resumen

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en la generación de péptidos inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA) después de la digestión de carne de cerdo mediante la acción secuencial de pepsina y pancreatina, simulando las condiciones del sistema digestivo. El hidrolizado fue analizado directamente mediante nanoLC-ESI-MS/MS, estudiando seguidamente las secuencias obtenidas a partir de los espectros MS/MS. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el potencial de las proteínas de la carne de cerdo como fuente de péptidos antihipertensivos después de la digestión gastrointestinal.

Estudios recientes han demostrado el potencial de la carne de cerdo al generar péptidos biológicamente activos con capacidad para regular numerosos procesos en el organismo [1], lo que otorga a la carne un valor añadido. En trabajos anteriores se han descrito péptidos con acción antioxidante, antimicrobiana o antihipertensiva por ejemplo [2]. La acción antihipertensiva ejercida por algunos péptidos es debida a su capacidad para inhibir la actividad ECA. En el presente estudio, se ha investigado la posible actividad inhibidora de la ECA de los péptidos generados en la digestión de las proteínas del músculo esquelético del cerdo por acción de las enzimas gastrointestinales. El proceso de digestión fue simulado *in vitro* usando pepsina y pancreatina

de manera secuencial. El hidrolizado obtenido fue posteriormente analizado mediante nanoLC-ESI-MS/MS utilizando un sistema Ultimate nano-LC acoplado a una fuente de iones nanoelectrospray y un espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) QSTAR XL. Todos los espectros MS/MS fueron interpretados utilizando los algoritmos MASCOT y Paragon. De este modo se lograron identificar una buena parte de los péptidos presentes en el hidrolizado; sin embargo, sólo aquellos con los requerimientos de tamaño y estructura adecuados para ser potenciales inhibidores de la ECA fueron sintetizados. La actividad inhibidora de la ECA de los péptidos sintetizados se realizó según el método desarrollado por Sentandreu y Toldrá [3].

Los péptidos que se identificaron en el hidrolizado y fueron posteriormente sintetizados para conocer su capacidad de inhibir la actividad ECA se muestran en la Tabla 1. A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestra el espectro de MS/MS correspondiente al péptido KAPVA.

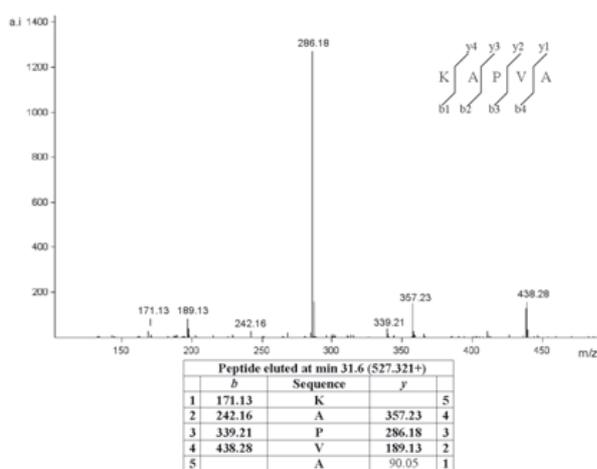


Figura 1. Espectro MS/MS del ion 527.321⁺ obtenido del análisis del hidrolizado de cerdo mediante nanoLC-ESI-MS/MS. Se muestran los iones y y b encontrados por MASCOT (resaltados en negrita).

Este pentapéptido mostró la mayor inhibición de la actividad ECA con un valor de IC₅₀ de 46.56 μM. KAPVA contiene una alanina en posición C-terminal. Éste amino ácido parece desempeñar un papel importante en su unión con la ECA [4]. La presencia de prolina en la antepenúltima posición del extremo C-terminal también parece promover la unión del péptido con la enzima [5]. Por su parte, el péptido PTPVP también mostró una notable inhibición de la ECA, con un valor de IC₅₀ de 256.41 μM. Éste péptido contiene un residuo de prolina en último y antepenúltimo lugar (Tabla 1). El resto de secuencias ensayadas mostraron moderada inhibición de la ECA. Se sabe que los péptidos de pequeño tamaño presentan una mayor facilidad para ser absorbidos en el tracto intestinal que los péptidos grandes [6]. Además, los péptidos que contienen prolina son generalmente más resistentes a la digestión enzimática [7]. En consecuencia, cabe esperar que los pentapéptidos KAPVA y PTPVP que mostraron una notable inhibición de la ECA y que además contienen residuos de prolina en sus secuencias, puedan mostrar una actividad antihipertensiva in vivo [8]. Los resultados obtenidos sugieren que la digestión fisiológica de las proteínas de la carne de cerdo puede promover la generación de péptidos bioactivos, apoyando la idea de que la carne de cerdo puede ser una buena fuente de constituyentes saludables. No obstante, son necesarios estudios in vivo para demostrar si los péptidos identificados pueden ejercer una acción antihipertensiva real.

Agradecimientos

Damos las gracias al Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) Proteomics core facility (miembro de Proteored), y en especial a Luz Valero, por su valiosa contribución en el análisis de espectrometría de masas.

Tabla 1. Identificación de péptidos presentes en el hidrolizado de proteínas mediante nanoLC-ESI MS/MS, obtenido por digestión enzimática de la carne de la carne de cerdo. La actividad inhibidora in vitro de la ECA está expresada como IC₅₀ (concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad ECA original).

tiempo de retención	masa calc	masa obs	secuencia	proteína origen de cerdo (NCBI accesion no.)	posición	IC ₅₀ (μM)
25,2	589,29	589,96	MMVPI	cytrocromo P450 3A46 (NP001128296)	394-398	>1000
28,54	445,26	446,26	IGGSI	beta-actina (ABI29185)	343-347	n.a ^a
31,6	526,31	527,32	KAPVA	titina (XP001925902)	4784-4788	46,56
35,43	509,28	511,33	PTPVP	titina (XP001925902)	4216-4220	256,41
36,01	519,27	520,28	YPGIA	beta-actina (ABI29185)	308-312	n.a
36,89	526,32	527,32	NIIPA	GAPDH ^b (ABI29187)	203-207	>1000
47,18	650,32	651,33	MYPGIA	beta-actina (ABI29185)	307-312	641,02
59,06	569,34	570,35	VIPEL	GAPDH (ABI29187)	218-222	799,24
60,35	603,35	604,36	INDPF	GAPDH (ABI29187)	31-35	n.a
64,87	569,34	570,36	VLPEI	titina (XP001925902)	4316-4320	>1000

^aActividad inhibidora de la ECA no encontrada. ^bGliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa

Referencias

- [1] Arihara, K. Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. *Advanced Technologies for Meat Processin*. CRC Press (Boca Raton) 2006; 245-246.
- [2] Yamamoto, N.; Ejiri, M.; Mizuno, S. Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Design* 2003; 9 (16): 1345-1355.
- [3] Sentandreu, M. A. Toldra, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-I converting enzyme activity. *Nature Protocols* 2006; 1 (5): 2423-2327.
- [4] Majumder, K.; Wu, J. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Simulated in Vitro Gastrointestinal Digestion of Cooked Eggs. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry* 2009; 57 (2): 471-477.
- [5] Rohrbach, M. S.; Williams, E. B.; Rolstad, R. A. Purification and Substrate-Specificity of Bovine Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of Biological. Chemistry* 1981; 256 (1): 225-230.
- [6] Hara, H.; Funabiki, R.; Iwata, M.; Yamazaki, K. I. Portal Absorption of Small Peptides in Rats Under Unrestrained Conditions. *Journal of Nutrition* 1984; 114 (6): 1122-1129.
- [7] Kim, S., Bertwhistle, W., & Kim, Y.W. Peptide hydrolyses on the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. *Journal of Clinical Investigation* 1972; 51: 1419-1430.
- [8] Nakashima, Y.; Arihara, K.; Sasaki, A.; Mio, H.; Ishikawa, S.; Itoh, M. Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Science* 2002; 67 (1): 434-437.