

Blanca Hernández-Ledesma^a, María del Mar Contreras, Isidra Recio, Mercedes Ramos*
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid, España

* Correspondencia: Dr. M. Ramos

Tel.: +34 91 5622900 Fax: +34 91 5644853

E-mail: mramos@ifi.csic.es

^a Dirección actual: Department of Nutritional Sciences and Toxicology, University of California
Berkeley, 119 Morgan Hall, Berkeley CA 94720, USA

1. Introducción

La leche es una excelente fuente de nutrientes. Mas allá de su bien documentada función nutricional, la leche ejerce un amplio rango de actividades biológicas que influyen sobre el sistema digestivo y metabólico, el crecimiento y desarrollo de los órganos y la resistencia a diversos trastornos y enfermedades. Estas actividades han sido atribuidas principalmente a las proteínas y péptidos secretados en la leche por la glándula mamaria. Sin embargo, algunas de las actividades biológicas de las proteínas lácteas se encuentran en un estado latente y requieren de procesos de proteólisis para su liberación. Así, los péptidos bioactivos corresponden a fragmentos inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora, pero que pueden liberarse mediante hidrólisis *in vivo* (durante la digestión gastrointestinal) o *in vitro* (durante el procesado de los alimentos) y en esta forma pueden ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo. Se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas (antihipertensiva, opiácea, antitrombótica, inmunomodulante, hipocolesterolemica, antioxidante, antiviral, antiproliferativa, etc) y han sido revisados en numerosos artículos (por ejemplo, Hernández-Ledesma y col., 2006; Korhonen y Pihlanto, 2006). Por ello, los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas juegan un papel importante en la salud y la nutrición. Generalmente

estos péptidos contienen entre 3 y 20 aminoácidos por molécula y su secuencia primaria define su función. Para que un péptido bioactivo ejerza la actividad tras su administración oral, es necesario que la forma activa del péptido sea resistente al proceso de digestión gastrointestinal, se produzca la absorción del mismo a través del epitelio gastrointestinal y alcance los órganos diana intacto o en forma de metabolitos activos. En este capítulo se revisa el estado actual de las investigaciones que se han llevado a cabo en los últimos años sobre péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas.

2. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial es uno de los principales riesgos de las enfermedades cardiovasculares y afecta aproximadamente a una cuarta parte de la población mundial (Fitzgerald y Murray, 2006). La presión arterial está regulada parcialmente por el sistema renina-angiotensina. Uno de los principales componentes de este sistema es la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1.). Esta enzima multifuncional se localiza en diversos tejidos y es conocida por su primordial y decisivo papel en la regulación de la presión arterial ya que cataliza la conversión de la Angiotensina I, un decapeptido inactivo, en Angiotensina II, un octapeptido de potente acción vasoconstrictora. Además, esta enzima cataliza la inactivación de las bradiquininas, compuestos con una importante actividad vasodilatadora. Por tanto, la inhibición de esta enzima provoca principalmente un efecto hipotensor.

Tras el descubrimiento del papel de la dieta en la prevención y tratamiento de la hipertensión, los esfuerzos de científicos e industrias alimentarias se han enfocado en la búsqueda de alimentos con actividad antihipertensiva. Proteínas de diversos alimentos, como los huevos, el atún, la gelatina y la soja, han sido descritas como precursoras de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (actividad IECA) *in vitro* o

actividad antihipertensiva *in vivo*. Sin embargo, hasta la actualidad, las proteínas lácteas son la principal fuente de estos péptidos bioactivos (Hartmann y Meisel, 2007).

Estos péptidos inhibidores de la ECA corresponden a diversos fragmentos de las caseínas conocidos como casoquininas, y a fragmentos derivados de las proteínas de suero, denominados lactoquininas. Debido a la relevancia de este grupo de péptidos bioactivos, en los últimos años se ha llevado a cabo una exhaustiva investigación enfocada en la identificación de nuevas secuencias peptídicas, así como en la elucidación de la relación estructura/actividad y el método de producción de dichas secuencias. Los resultados de esta investigación han sido descritos en múltiples artículos de revisión (Korhonen y Pihlanto, 2003; Fitzgerald y Murray 2006; Hernández-Ledesma y col., 2006, 2007b). Incluso, aspectos relacionados con la biodisponibilidad de estos péptidos y sus propiedades fisiológicas, químicas y tecnológicas han sido revisadas por otros autores (López-Fandiño y col., 2006; Vermeirssen y col., 2004).

Relación estructura actividad

La relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ECA no está totalmente definida. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado la importante influencia de los tres aminoácidos situados en el extremo carboxilo terminal sobre la unión a la enzima. La ECA tiene afinidad por substratos o inhibidores competitivos que contengan residuos hidrofóbicos en cualquiera de las tres últimas posiciones del extremo carboxilo terminal. Estudios de inhibición llevados a cabo con di-péptidos de diversa estructura han concluido que los aminoácidos Trp, Tyr, Phe o Pro presentes en estas posiciones del extremo C-terminal son más efectivos para la unión del inhibidor a la ECA. Además, la unión se ve favorecida si el péptido contiene el aminoácido Pro como último o antepenúltimo residuo, viéndose debilitada si este aminoácido ocupa la posición penúltima en la secuencia peptídica (Cheung y col.,

1980). La potencia inhibidora del péptido también se ve favorecida por la presencia de la carga positiva de los aminoácidos Lys o Arg en el extremo C-terminal. En los últimos años se han utilizado técnicas bioinformáticas para poder establecer los requisitos estructurales que deben presentar los péptidos inhibidores de la ECA, son los denominados modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR). Así, mediante un modelo QSAR para péptidos de hasta 6 aminoácidos derivados de proteínas lácteas, Pripp y col. (2004) pudieron concluir que había una relación entre la actividad IECA y la presencia de un aminoácido hidrofóbico o cargado positivamente en la última posición de la secuencia, sin embargo, no se encontró ninguna relación entre la estructura del extremo N-terminal. Por otro lado, Wu y col. (2006) a través de un modelo QSAR para péptidos que contenían entre 4 y 10 aminoácidos observaron que el residuo del tetrapéptido del C-terminal puede decidir la potencia IECA, siendo preferentes los aminoácidos Tyr y Cys en primera posición del C-terminal, en segunda posición His, Trp y Met, en tercera posición Ile, Leu, Val y Met y en cuarta posición Trp. De este modo, péptidos que presentan el tripéptido C-terminal idéntico, pueden poseer actividades muy diferentes dependiendo de su secuencia y del aminoácido adyacente al tripéptido C-terminal. Por ejemplo, Gómez-Ruiz y col. (2004a) observaron que el péptido de secuencia VRYL era más activo que el péptido VPSERYL, ambos identificados en un queso Manchego.

Por otro lado, la configuración que puede adoptar el péptido dependiendo de las condiciones ambientales y la conformación estructural final que puede adquirir el péptido pueden ser determinantes de la actividad IECA. De tal forma, las secuencias que contienen *trans*-Pro en su extremo C-terminal son mejores sustratos de la enzima que las que contienen *cis*-Pro, como ejemplo cabe citar el estudio llevado a cabo por Gómez-Ruiz y col. (2004b). Los isómeros L y D de los aminoácidos en algunas

posiciones de la secuencia peptídica también influyen en la estereoespecificidad de la ECA (Maruyama y col., 1987).

Biodisponibilidad

El potencial antihipertensivo de un péptido es dependiente de su capacidad para alcanzar, sin ser degradados por las enzimas intestinales o sanguíneas, los órganos diana, tanto en el margen luminal del tracto intestinal como en los órganos periféricos. La resistencia a estas enzimas es un requisito esencial para el efecto antihipertensivo de péptidos inhibidores de la ECA tras su ingestión oral o su administración por vía intravenosa. Por lo tanto, es importante distinguir entre péptidos cuya actividad antihipertensiva ha sido demostrada mediante estudios *in vivo* en animales de experimentación y ensayos clínicos en humanos y péptidos cuya actividad ha sido sólo evaluada mediante ensayos *in vitro*. Diversos autores han descrito un incremento de la actividad IECA tras la acción de enzimas digestivas sobre soluciones de caseína fermentada (Pihlanto-Leppälä y col., 1998; Vermeirssen y col., 2003). Sin embargo, en otros casos, la digestión gastrointestinal es responsable de la hidrólisis de potentes péptidos inhibidores de la ECA y la consecuente pérdida de su actividad antihipertensiva *in vivo*. Así, por ejemplo, el péptido correspondiente al fragmento 142-148 de la β -lactoglobulina, conocido por su elevada actividad IECA *in vitro*, no es resistente a la acción de las proteinasas y peptidasas intestinales y sanguíneas (Walsh y col., 2004). Igualmente, Maruyama y colaboradores (1987) demostraron que el fragmento 23-27 de la α_{s1} -caseína presentaba una elevada capacidad inhibidora de la ECA y un nulo efecto antihipertensivo *in vivo*.

2.1. Péptidos con actividad IECA y antihipertensivos derivados de proteínas lácteas por fermentación microbiana

En leches fermentadas

Los procesos de fermentación microbiana se han considerado como una de las mejores estrategias en la obtención de péptidos inhibidores de la ECA y/o péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas. Durante los procesos de fermentación, las enzimas presentes en los microorganismos degradan las caseínas permitiendo la liberación de péptidos y aminoácidos esenciales para su crecimiento. Algunos de estos péptidos han sido identificados y caracterizados como inhibidores de la ECA y/o antihipertensivos. En la tabla 1 se muestran aquellos péptidos identificados hasta la actualidad como responsables del efecto antihipertensivo de productos lácteos fermentados.

Diferentes especies de bacterias lácticas han demostrado la capacidad de fermentar la leche generando productos fermentados con elevada actividad IECA. La combinación de las cepas *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, empleadas durante la elaboración de una leche fermentada comercializada en Japón (Nakamura y col., 1995a) (Calpis, Calpis Co. Ltd., Tokyo, Japan), es esencial en la producción de péptidos con un demostrado efecto antihipertensivo tanto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Nakamura y col., 1995b) como en pacientes hipertensos (Hata y col., 1996). De una manera similar, un producto generado tras la fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H ejerció un significativo efecto antihipertensivo en un ensayo clínico llevado a cabo con humanos hipertensos (Seppo y col., 2002; 2003). Este producto ha sido comercializado con el nombre de Evolus® (Valio Ltd, Finlandia o Kaiku Vitabrand®, España). En ambos productos, los péptidos Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP) fueron identificados como responsables del efecto antihipertensivo de los mismos (Sipola y col., 2001). Además, la presencia de estos tri-péptidos fue detectada tras su administración oral en la arteria aorta de

ratas SHR, siendo considerado como el órgano diana en el efecto antihipertensivo (Masuda y col., 1996). Recientemente, la compañía francesa Danone está comercializando el producto Danatén® en España que también contiene estos tri péptidos y ha sido fabricado con una nueva cepa de *Lactobacillus helveticus* (Degivry, M-C., 2007; Garault, 2007; Queguiner, 2007).

Otros péptidos con actividad IECA fueron aislados y caracterizados a partir de una leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti y col., 2000; Ashar y Chand, 2004). Hernández-Ledesma y col. (2004) estudiaron la actividad IECA de leches fermentadas comerciales, mostrando la mayoría una moderada actividad. Esta actividad se mantenía estable o aumentaba durante el proceso de simulación gastrointestinal. Asimismo, se han identificado péptidos cuyas características estructurales son similares a péptidos con actividad IECA previamente descritos. Además de productos lácteos de origen bovino, la actividad IECA de yogures fabricados con leche ovina (Chobert y col., 2005) y kéfir de leche de cabra (Quirós y col., 2005) ha sido investigada. En este último producto se ha identificado el péptido de secuencia PYVRYL (fragmento 203-208 de la α_{s2} caseína) que exhibe una potente actividad IECA (IC_{50} de 2,4 μ M) y antihipertensiva en ratas SHR (Recio y col., 2006).

Recientemente, Nielsen y col. (2009) han estudiado el efecto de la cepa, pH de la fermentación (4.6, 4.3 y 3.5) y tiempo de almacenamiento (de 1 a 7 días a 5 °C) sobre el perfil peptídico y actividad IECA en 13 cepas de la colección de Hansen. Las cepas que mostraron mayor actividad IECA correspondieron a dos de las cepas de *Lactobacillus helveticus* empleadas y a las cepas de *Lactococcus lactis*.

Nuestro grupo de investigación en colaboración con la empresa Leche Pascual, evaluaron la actividad IECA de diferentes leches fermentadas producidas con 231 cepas de microorganismos aisladas de muestras de leche de vaca cruda. Entre ellas,

Tabla 1. Actividad IECA y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas de péptidos derivados de caseínas y proteínas de suero obtenidos por procesos de fermentación microbiana (Adaptada de Hernández-Ledesma y col., 2006).

Fragmento peptídico	Secuencia ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	Máximo descenso de la PSS (mmHg) ^c	Origen	Referencia
α ₅₁ -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13.4	-9.3	Queso Gouda	Saito y col., 2000
α ₄₅₁ -CN f(146-147)	YP	720	-32.1	Fermentación con <i>Lactobacillus helveticus</i> CPN4	Maeno y col., 1996
β-CN f(58-76)	LVYFPFGPIPNS LPQNIIP	5.2	-15.0	Fermentación con <i>Enterococcus faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(60-68)	YFPFGPIP	14.8	-7.0	Queso Gouda	Saito y col., 2000
β-CN f(74-76)	IPP	5.0	-28.3 (-10.1) ^d	Fermentación con <i>L. helveticus</i> y <i>Saccharomices cerevisiae</i>	Nakamura y col., 1995a, b
β-CN f(84-86)	VPP	9.0	-32.1 (-10.1) ^d	Fermentación con <i>L. helveticus</i> y <i>S. Cerevisiae</i>	Nakamura y col., 1995a, b
β-CN f(133-138)	LHLPLP	5.5	-21.9	Fermentación láctea con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(133-139)	LHLPLPL	425	-7.7	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(197-206)	VLGPVRGPFPP	137	-16.2	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(201-209)	VRGPFPIIV	599	-16.1	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007

^a: Código de una letra de la secuencia de aminoácidos

^b: Concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad original de la enzima IECA

^c: Presión sanguínea sistólica (valor medio)

^d: Efecto antihipertensivo en humanos

cuatro cepas de *Enterococcus faecalis* producían leches fermentadas con potente actividad IECA y efecto antihipertensivo en ratas SHR (Muguerza y col., 2006). Se identificaron ocho péptidos en estas leches fermentadas, y se determinó la actividad antihipertensiva tras su administración por vía oral. Dos de estos péptidos, que correspondieron a los fragmentos 133-138 y 58-76 de la β -caseína (LHLPLP y LVYFPFGPIPNLSLPQNIPP, respectivamente) mostraron valores de IC₅₀ inferiores de 5 μ M y un potente efecto antihipertensivo en ratas SHR (Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2007) (Tabla 1). Se comprobó también que el producto obtenido por fermentación con estas cepas disminuía el desarrollo de la hipertensión durante un estudio crónico en ratas hipertensas (Miguel y col., 2005). Para profundizar en el estudio de los péptidos más activos, se ha estudiado la biodisponibilidad de los mismos mediante procesos de simulación gastrointestinal y estudios de transporte a través de células Caco-2. Se pudo comprobar que el LHLPLP fue el único péptido que resistió la hidrólisis con enzimas digestivas. Sin embargo, este péptido fue hidrolizado por las peptidasas de las células del epitelio intestinal dando lugar al péptido HLPLP. Este penta-péptido es transportado a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la difusión pasiva el principal mecanismo de transporte de este péptido. Además, el péptido HLPLP es resistente a las peptidasas plasmáticas humanas, por lo que podría ser la forma activa del péptido LHLPLP (Quirós y col., 2008).

En quesos

Durante la maduración del queso, pueden formarse péptidos con actividad IECA por acción de las proteinasas asociadas a la pared celular de las bacterias lácticas y de las peptidasas intracelulares. Saito y col. (2000) determinaron la actividad IECA y antihipertensiva de la fracción peptídica de quesos comerciales, como el Gouda, Edam, Emmental, Camembert, Havarti y queso Azul. De las 6 tipos de queso examinados, 4 de ellos mostraron efecto antihipertensivo siendo el queso Gouda de 8

meses de maduración el que presentaba mayor actividad antihipertensiva cuando se administraba a ratas SHR. Se han identificado en dicho queso los fragmentos 60-68 de β -caseína y 1-9 de α_{s1} -caseína, que presentaron una potente actividad IECA, con valores de IC_{50} de 14.8 y 13.4 μ M, respectivamente, pero una débil actividad antihipertensiva. Este último fragmento también ha sido identificado en el queso Festivo, un nuevo tipo de queso bajo en grasa, desarrollado en Finlandia (Ryhänen y col., 2001). Varios péptidos inhibidores de la ECA han sido aislados de extractos procedentes de quesos comercializados en Italia y España (Gómez-Ruiz y col., 2006; Smacchi y Gobbetti, 1998), así como de un queso Manchego preparado tras la inoculación de leche con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* (Gómez-Ruiz y col., 2002). Más recientemente, Bütikofer y col. (2007; 2008) han determinado la concentración de los péptidos antihipertensivos VPP e IPP en 44 muestras de quesos comerciales duros y semi-duros y en 101 muestras de 10 variedades distintas de Quesos suizos. En general, se observó que el péptido VPP estaba en más alta concentración que el IPP y que existían diferencias en la concentración de los péptidos entre los diferentes quesos. La concentración más alta de los tripéptidos se encontró en una variedad de queso Appenzeller.

2.2. Péptidos con actividad IECA y antihipertensivos derivados de proteínas lácteas por hidrólisis enzimática

Un gran número de estudios llevados a cabo durante las últimas dos décadas han demostrado la formación de péptidos inhibidores de la ECA y/o antihipertensivos a partir de hidrolizados de proteínas lácteas. Estos péptidos se muestran en la Tabla 2. Los péptidos inhibidores de la ECA más potentes ($IC_{50} < 30 \mu$ M) proceden de hidrolizados de caseinatos y caseínas con tripsina o con la proteinasa extracelular de

Lactobacillus helveticus (Maruyama y col., 1987; Robert y col., 2004; Tauzin y col., 2002; Yamamoto y col., 1994).

Con el objetivo de poder obtener los péptidos VPP e IPP por hidrólisis enzimática, en lugar de por fermentación, se ha producido un hidrolizado de caseínas con una proteasa de *Aspergillus oryzae*. Además, este hidrolizado presenta una potente actividad IECA y antihipertensiva en ratas (Mizuno y col., 2004) y en humanos (Mizuno y col., 2005; Sano y col., 2005). A partir de este hidrolizado, Calpis ha diseñado AmealPeptide®, también conocido como Lactotripeptide™ (LTP). En Estados Unidos también se comercializa como el ingrediente del suplemento dietético Ameal bp™. Recientemente, un hidrolizado que contiene el péptido IPP ha sido producido mediante la hidrólisis del glicomacropéptido de origen bovino con una preparación enzimática derivada de *Aspergillus niger*. Este producto se comercializa como Tensguard™ por la compañía holandesa DSM Food Specialties. Ponstein-Simarro Doorten y col. (2009) han llevado a cabo estudios toxicológicos de este producto mediante ensayos de genotoxicidad *in vitro* y estudios de toxicidad *in vivo* en ratas.

Además, también ha sido comercializado un hidrolizado de caseína con tripsina con propiedades antihipertensivas en Japón bajo el nombre de Casein DP (Kanebo Ltd.) (Sekiya y col., 1992; Sugai, 1998). Posteriormente, otro hidrolizado tréptico de caseína se comercializó en Holanda bajo la denominación de C12 Peption™ (DMV internacional) (Cadee y col., 2007). Ambos productos presentan el fragmento 23-34 de α_{s1} -caseína de secuencia FFVAPFPEVFGK.

En nuestro laboratorio, Recio y col. (2006), han identificado, dos nuevas secuencias peptídicas derivadas de la α_{s1} caseína con actividad IECA y potente actividad antihipertensiva en el hidrolizado de caseína con pepsina. También se ha demostrado el efecto antihipertensivo en ratas SHR, de un hidrolizado de caseínas con pepsina y la fracción menor de 3000 Da del hidrolizado (Miguel y col., 2009).

Tabla 2. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de la Angiotensina y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas de péptidos derivados de caseínas y proteínas de suero por procesos de hidrólisis enzimática (Adaptada de Hernández-Ledesma y col., 2006).

Fragmento peptídico	Secuencia ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	Máximo descenso de la PSS (mmHg) ^c	Origen	Referencia
α ₅₁ -CN f(23-34)	FFVAPFPQVFGK	77	-34.0	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α ₅₁ -CN f(104-109)	YKVPQL	22	-13.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α ₅₁ -CN f(194-199)	TTMLPW	16	-13.6	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α ₅₂ -CN f(189-192)	AMPKPW	580	-5.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α ₅₂ -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300	-3.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α ₅₂ -CN f(198-202)	TKVIP	400	-9.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α ₅₂ -CN f(203-208) ^d	PYVRYL	1.9	23.4	Hidrólisis con pepsina	Recio y col., 2006
β-CN f(59-61)	VYP	288	-21.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(59-64)	VYVFPQ	221	-22.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(60-90)	TPVVPPFLQP	749	-8.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(140-143)	LOSW	500	-2.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(169-174)	KVLPVP	5	-32.2	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(169-175)	KVLPVPO	1000	-31.5	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(177-183)	AVPYPQR	15	-10.0	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α-La f(50-53)	YGLF	733	-23.0	Hidrólisis con enzimas gástricas y pancreáticas	Nurminen y col., 2000
β-Lg f(58-61) ^e	LQKW	34.7	-18.1	Hidrólisis con termolisina	Hernández-Ledesma y col., 2007a
β-Lg f(78-80)	IPA	141	-31.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-Lg f(103-105) ^e	LLF	79.8	-29.0	Hidrólisis con termolisina	Hernández-Ledesma y col., 2007a
β-Lg f(142-145)	ALPM	928	-21.4	Producto de suero comercial	Murakami y col., 2004
β ₂ -m ^f f(18-20)	GKP	352	-26.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
BSA f(221-222)	FP	315	-27.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998

^a: Código de una letra de la secuencia de aminoácidos

^b: Concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad original de la enzima ECA

^c: Presión sanguínea sistólica (valor medio)

^d: Proteína de origen ovino

^e: Proteína de origen caprino

^f: β₂-microglobulina

Respecto a las proteínas de suero, la hidrólisis con una combinación de enzimas digestivas u otras enzimas con alto poder proteolítico y baja especificidad, como la termolisina o la proteinasa K, permite la producción de hidrolizados con un gran número de potentes péptidos inhibidores de la ECA (Abubakar y col., 1998; Hernández-Ledesma y col., 2002; Mullally y col., 1997; Nurminen y col., 2000; Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Por ejemplo, el péptido denominado β -lactosin A [IPA, f(78-80)], se ha identificado en un hidrolizado de β -lactoglobulina con proteinasa K. Aunque este péptido mostró una moderada actividad IECA, presentó una potente actividad antihipertensiva en ratas SHR (Abubakar y col., 1998). En un estudio con un hidrolizado de β -lactoglobulina de cabra preparado con termolisina, se identificaron dos potentes inhibidores de la ECA, de secuencias LLF y LQKW, y posteriormente, se demostró su efecto antihipertensivo en ratas SHR (Hernández-Ledesma y col., 2002 y 2007a).

La hidrólisis de α -lactalbúmina con enzimas gástricas y pancreáticas produjo la liberación del tetra-péptido YGLF que presentó actividad opiácea y antihipertensiva en ratas normotensas y SHR, siendo esta última actividad debida a su efecto como antagonista de receptores opiáceos (Ijäs y col., 2004). Estos resultados sugieren que otros mecanismos de acción, diferentes a la inhibición de la ECA pueden estar involucrados en el efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas lácteas.

3. Perspectivas futuras

Un elevado número de estudios llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* revelan que los péptidos antihipertensivos pueden ser liberados a partir de proteínas lácteas tras procesos de fermentación microbiana y/o hidrólisis enzimática. Estos péptidos bioactivos no son tan potentes como los fármacos usados de forma común en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, pueden considerarse como una fuente altamente interesante de ingredientes bioactivos que se puede incorporar en alimentos y ser usados en la prevención de la hipertensión arterial y consecuentemente de los trastornos cardiovasculares, manteniendo un adecuado estado de salud.

El diseño de nuevos productos lácteos promotores de la salud conteniendo estos péptidos aparece prometedor y atractivo para productores y consumidores. Sin embargo, sería necesario: A) Una investigación más exhaustiva que resuelva diversos aspectos científicos y tecnológicos de la aplicación de péptidos bioactivos como ingredientes de alimentos funcionales y nutracéuticos. B) El desarrollo de estrategias para la producción y enriquecimiento de fracciones de péptidos bioactivos, como las técnicas cromatográficas y las técnicas de membrana. C) La aplicación de nuevos experimentos con animales y ensayos clínicos doble-ciego en humanos para verificar *in vivo* la eficacia de los péptidos antihipertensivos, así como sus efectos a largo plazo una vez administrados por vía oral de forma regular. El mecanismo de acción de los péptidos bioactivos y los efectos adversos asociados a su uso deberían ser cuidadosamente considerados en estos ensayos. Adicionalmente a los aspectos fisiológicos, la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos y sus propiedades tecnológicas deberían de ser estudiadas con el objetivo de desarrollar alimentos modelo que contengan estos péptidos y mantengan su actividad durante un periodo de garantía. La interacción de estos péptidos con otros componentes alimentarios, como los hidratos de carbono o los lípidos, así como la influencia de las condiciones del procesado (especialmente el calentamiento) sobre la actividad biológica del péptido

deberían de ser también investigadas. Desde el punto de vista comercial, otros aspectos como la relación coste-eficacia del ingrediente, la facilidad de incorporación a su producto y sus características organolépticas son también de gran importancia. Finalmente, los datos obtenidos de los ensayos clínicos son esenciales para formular rigurosos anuncios de salud y el adecuado etiquetado del producto final que contiene al ingrediente bioactivo.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CYTED XI.24. También se agradece a los Proyectos Consolider 2010 CS-063 y CM-S0505 -AGR-0153 y AGL-2007 065035.

Blanca Hernández-Ledesma disfruta de un contrato post-doctoral Marie-Curie de la Comisión Europea coordinado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

María del Mar Contreras disfruta de una beca DANONE.

Referencias

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.
- Ashar, M. N., Chand, R. (2004). Antihypertensive peptides purified from milks fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, 59, 14-17.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17, 968-975.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D. (2008). Occurrence of the Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibiting Tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in Different Cheese Varieties of Swiss Origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29-38.
- Cadee, J. A., Chang, C-Y., Chen, C-W., Huang, C-N., Chen, S-L., Wang, C-K. (2007). Bovine casein hydrolysate (C12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects. *American Journal of Hypertension*, 20, 1-5.
- Cheung, H-S., Wang, F-L., Ondetti, M. A. Sabo, E. F., Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide-substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chobert, J-M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarroondo, M., Métro, F., Choiset, Y., Haertlé, T. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yogurts obtained by using different starter. *Lait*, 85, 141-152.
- Degivry, M-C., Alvarez, C., Queguiner, C., Mignot, I., Saint Denis, T. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International patent WO/2007/096497*.
- Fitzgerald, R. J., Murray, B. A., (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal Dairy Technology*, 59, 118-125.
- Garault, P., Pierson, A., Gaye, C., Degivry, M-C., Saint-Denis, T. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International Patent WO/2007/096495*.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiol*, 66, 3898–3904.

- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697-706.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2004a). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 14, 1075-1080.
- Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I., Belloque, J. (2004b). ACE inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [β -CN f(47–51)]. Study of the peptide forms synthesised by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6315–6319.
- Gómez-Ruiz, J. A., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., Ramos, M., (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research Technology*, 223, 595-601.
- Hartmann, R., Meisel, H (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hata, Y., Yamamoto, N., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 767-771.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., López-Expósito, I., Ramos, M., Recio, I. (2006). Bioactive peptides from milk proteins. In *Immunochemistry in Dairy Research*, 37-60. Research Signpost ISBN:81-308-0102-7.
- Hernández-Ledesma, B., Miguel, M., Amigo, L., Aleixandre, M. A., Recio, I., (2007a). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the anti-hypertensive properties of synthetic β -lactoglobulin peptide sequences. *Journal of Dairy Research*, 74, 336-339.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Amigo, L. (2007b). β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35, 257-265.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12, 805-812.

- Ijäs, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M-L. (2004). Antihypertensive opioid-like milk peptide alpha-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice. *International Dairy Journal*, 14, 201-205.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 96, 367-371.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 129-134.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277–1293.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316-1321.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α -s1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.
- Masuda, O., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*, 126, 3063-3068.
- Miguel, M., Muguera, B., Sánchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M. A. (2005). Changes in arterial blood pressure in caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *British Journal of Nutrition*, 93, 1-9.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal of Dairy Science*, 89, 3352-3359.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 112, 211-214.

- Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., Yamamoto, N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94, 84–91.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., Yamamoto, N., (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science*, 87, 3183-3188.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.
- Mullally, M. M., Meisel, H., Fitzgerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99-101.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., Saito, T. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*, 87, 1967-1974.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. (1995a). Purification and characterization of Angiotensin I-converting enzyme-inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K. I., Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19, 155-165.
- Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H., Vapaatalo, H. (2000). α -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66, 1535-1543.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53-64.

- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325–331.
- Ponstein-Simarro Doorten, A. Y., vd Wiel, J. A. G., Jonker, D. (2009). Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 55-61.
- Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sorhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 219, 579-583.
- Queguiner, C.; Druesne, A.; Alvarez, C; Pierson, A., Colin, C. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International Patent WO/2007/096498*, European Patent PCT/FR2007/000251.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2005). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 3480–3487.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33–41.
- Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M. A., Ramos, A., Recio, I. (2008). Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal*, 18, 279-286.
- Recio, I., Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Ruiz, J. A., Miguel, M., Amigo, L., López-Expósito, I., Ramos, M., Aleixandre, M. A., Contreras, M. (2006). Péptidos bioactivos identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas y procedimiento de obtención. *European Patent PCT/ES2006/070079*.
- Robert, M-C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M.A. (2004). Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6923-6931.
- Ryhänen, E-L., Pihlanto-Leppala, A., Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11, 441-447.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., Nakagawa, S., Kajimoto, Y. y Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with

- protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of Medicinal Food*, 8, 423-430.
- Sekiya, S., Kobayashi, Y., Kita, E., Imamura, Y., Toyama, S. (1992). Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 45, 513-517.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 326-330.
- Seppo, L., Keröjoki, O., Suomalainen, T., Korpela, R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension—a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 57, 124-127.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52, 745-754.
- Smacchi, E., Gobbetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 687-694.
- Sugai, R. (1998). ACE inhibitors and functional foods. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 336, 17-20.
- Tauzin, J., Miclo, L., Gaillard, J-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α s2-casein. *FEBS Letters*, 531, 369-374.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L. y Verstraete, W. (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *Journal of Dairy Science*, 86, 429-438.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. A., MacDonald, J., Pentzien, A-K., Wright, G. A., Wal, J-M., Struthers, A. D., Meisel, H., FitzGerald, R. J. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of Dairy Science*, 87, 3845-3857.

- Wu, J., Aluko, R. E., Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modelling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *QSAR & Combinatorial Science*, 25, 873-880.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.