



**LIPROVE**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Universidad Nacional de La Plata**

***"BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN  
HIDROLIZADOS DE LACTOSUERO BOVINO  
OBTENIDOS EMPLEANDO FITOPEPTIDASAS"***



**Juan Ignacio Bertucci**

**Laboratorio de Procesos Biotecnológicos**

**Directoras**  
**Dra. Mariela Bruno**  
**Dra. Graciela Garrote**

**Año 2012**

## *AGRADECIMIENTOS*

Muchas gracias:

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por brindarme la oportunidad de tener una formación profesional.

Al LIPROVE, su Director Néstor O. Caffini y todas las personas que allí conocí por acompañarme en cada paso de este trabajo.

A Laura, por abrirme las puertas del LIPROVE.

A Sebastián Trejo, de la Universidad Autónoma de Barcelona, por realizar los ensayos de MALDI-TOF.

A Gustavo Parisi, por su ayuda en bioinformática.

A toda mi familia y mis amigos por acompañarme a cada momento y brindarme su cariño y apoyo.

A Barby y la familia Román, por todo su afecto y contención.

Esta tesina de licenciatura esta dedicada a mis directoras Mariela Bruno y Graciela Garrote, por enseñarme todo, por el tiempo que me brindaron, por su dedicación, esfuerzo y paciencia. A la memoria de mi abuelo Luis, que me guía desde el cielo.

<b>Objetivos</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
1. <i>Proteasas y su clasificación</i>	3
1.1. <i>Clasificación</i>	3
2. <i>Aplicaciones industriales de las proteasas</i>	4
2.1. <i>Fitoproteasas</i>	6
3. <i>Hieronymaína y Pomiferina</i>	7
4. <i>Lactosuero bovino</i>	8
4.1. <i>Características de las proteínas del suero</i>	10
5. <i>Hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos</i>	11
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>17</b>
<i>Sección A: Análisis de sueros obtenidos por coagulación enzimática de leche tratada con Quimosina, Hieronymaína y Pomiferina.</i>	18
1. <i>Material vegetal</i>	18
1.1. <i>Frutos de <i>Maclura pomifera</i></i>	18
1.2. <i>Frutos de <i>Bromelia hieronymi</i></i>	18
2. <i>Obtención del extracto crudo (EC)</i>	18
2.1. <i>Pomiferina</i>	18
2.2. <i>Hieronymaína</i>	19
2.3. <i>Preparación de suspensiones de Bromelina y Quimosina</i>	19
3. <i>Purificación de los extractos crudos por precipitación etanólica fraccionada</i>	19
3.1. <i>Pomiferina</i>	19
3.2. <i>Hieronymaína</i>	20
4. <i>Cuantificación de proteínas</i>	20
5. <i>Ensayos de actividad caseinolítica</i>	20
6. <i>Ensayos de coagulación</i>	21
7. <i>Preparación de lactosuero</i>	21
7.1. <i>Electroforesis de los sueros</i>	22
7.2. <i>Determinación de actividad antioxidante</i>	24
7.2.1. <i>Determinación del poder antioxidante mediante la inhibición de la decoloración del <math>\beta</math>-caroteno</i>	25
7.2.2. <i>Evaluación del poder antioxidante mediante la reducción del radical DPPH</i>	25

7.3. Ensayo de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina	26
<b>Sección B:</b> Estudio de los hidrolizados obtenido por la acción de las enzimas Hieronymaina y Pomiferina sobre lactosuero comercial y lactosuero obtenido por coagulación con Quimosina	27
1. Preparación de suspensiones de lactosuero	27
2. Hidrólisis del suero	27
3. Electroforesis de los hidrolizados	28
4. Determinación del grado de hidrólisis	28
5. Análisis de los péptidos presentes en los hidrolizados	30
5.1. Concentración de los péptidos por Lowry	30
5.2. Análisis por HPLC	30
5.3. Análisis por MALDI-TOF	31
<b>Sección C:</b> Análisis de las propiedades antihipertensiva, antioxidante y antibacteriana de los hidrolizados	32
1. Ensayo de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina	32
2. Determinación de la actividad antioxidante	32
3. Análisis Bioinformático de las proteínas de lactosuero	32
4. Detección de actividad antimicrobiana	33
4.1. Ensayos de difusión en placa	33
4.2. Ensayo de dilución	34
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>38</b>
<b>Sección A</b>	39
1. Obtención y caracterización de los Extractos Crudos y los Precipitados Etanólicos Redisueltos de Hieronymaina y Pomiferina	39
1.1. Actividad específica de los extractos proteolíticos	39
1.2. Empleo de Pomiferina como coagulante de la leche	40
2. Electroforesis de los sueros obtenidos por coagulación de leche con Pomiferina y Hieronymaina	42
3. Determinación de la actividad antioxidante de los sueros obtenidos por coagulación de leche con Pomiferina y Hieronymaina	46
4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA de los sueros obtenidos por coagulación de leche con Pomiferina y Hieronymaina	47
4.1. Determinación del obtenido peptídico del lactosuero obtenido con Pomiferina	48

---

4.2. <i>Actividad inhibitoria de la ECA</i>	49
<b>Sección B</b>	52
1. <i>Obtención de hidrolizados y seguimiento por electroforesis</i>	52
2. <i>Determinación del grado de hidrólisis</i>	53
3. <i>Concentración de péptidos de los hidrolizados</i>	55
4. <i>Análisis por HPLC de los hidrolizados del suero lácteo</i>	56
5. <i>Análisis por MALDI-TOF</i>	58
<b>Sección C</b>	61
1. <i>Actividad Inhibitoria de la ECA</i>	61
2. <i>Análisis bioinformático de las proteínas de lactosuero</i>	64
3. <i>Ensayos de actividad antimicrobiana</i>	76
4. <i>Ensayos de dilución</i>	81
<b>Conclusiones</b>	89
<b>Anexo I</b>	93
<b>Referencias bibliográficas</b>	99

**INDICE DE TABLAS**

<i>Tabla 1. Desarrollo histórico de procesos enzimáticos industriales</i>	5
<i>Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de proteasas vegetales</i>	6
<i>Tabla 3. Composición proteica del lactosuero</i>	9
<i>Tabla 4. Hidrolizados y sus aplicaciones</i>	13
<i>Tabla 5. Péptidos bioactivos y sus efectos</i>	16
<i>Tabla 6. Composición del Buffer para armar el gel</i>	22
<i>Tabla 7. Composición del gel para armar dos placas</i>	23
<i>Tabla 8. Buffer de Muestra</i>	23
<i>Tabla 9. Composición del buffer anódico</i>	23
<i>Tabla 10. Composición del buffer catódico</i>	24
<i>Tabla 11. Composición de la solución fijadora</i>	24
<i>Tabla 12. Composición de la solución colorante</i>	24
<i>Tabla 13. Composición de la solución decolorante</i>	24
<i>Tabla 14. Volúmenes y concentraciones utilizados para la curva de concentración</i>	29
<i>Tabla 15. Concentración de proteínas, actividad caseinolítica y actividad específica del Extracto Crudo y los Precipitados Etanólicos Redisueltos</i>	39
<i>Tabla 16. Concentración de proteínas, actividad caseinolítica y actividad específica del Extracto Crudo y Precipitado Etanólico Redisuelto de Hieronymaína</i>	40
<i>Tabla 17. Valor de <math>R^2</math> para cada serie de datos de la Figura 5</i>	41
<i>Tabla 18. Pendiente de la curva de fluorescencia en función del tiempo</i>	49
<i>Tabla 19. Concentración peptídica de los hidrolizados filtrados</i>	56

---

<i>Tabla 20. Péptidos resultantes del análisis de las masas del Maldi ToF con el programa FindPept, que poseen una diferencia de masas menor a 0.05 Da</i>	60
<i>Tabla 21. Porcentaje de inhibición de la ECA para cada uno de los hidrolizados del SLQ con Pomiferina y Hieronymaina</i>	62
<i>Tabla 22. Valores de IC50 para los hidrolizados del SLQ con Pomiferina (P180) y Hieronymaina (H180) de 180 minutos</i>	63
<i>Tabla 23. Propiedades físicoquímicas de la secuencia consenso</i>	70
<i>Tabla 24. Ensayo de inhibición del crecimiento de E. coli por el método de difusión en agar de los sueros hidrolizados durante distintos tiempos mediante la acción de las enzimas Pomiferina y Hieronymaina, llevados a distintos pH</i>	77
<i>Tabla 25. Valores de absorbancia promedio de los duplicados</i>	82
<i>Tabla 26. Valores de absorbancia promedio de los duplicados (E. coli)</i>	84
<i>Tabla 27. Valores de absorbancia promedio de los duplicados (B. cereus)</i>	86

# OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue la obtención y caracterización de hidrolizados de proteínas de suero lácteo bovino empleando fitopeptidasas presentes en *Bromelia hieronymi* y *Maclura pomifera* con la finalidad de generar péptidos bioactivos y aumentar así el valor agregado de este material de descarte de la industria láctea.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad coagulante de la leche de un extracto de *Maclura pomifera* y determinar las condiciones óptimas de este proceso.
- Establecer el perfil peptídico del lactosuero recuperado.
- Determinar la actividad antioxidante, e inhibitoria de la ECA en los sueros exudados.
- Obtener hidrolizados de proteínas de lactosuero bovino empleando peptidasas de *Maclura pomifera* y *Bromelia hieronymi* en diferentes condiciones.
- Determinar grado de hidrólisis y concentración de péptidos de los hidrolizados obtenidos y caracterizar el perfil peptídico por SDS-PAGE y cromatografía en fase reversa.
- Analizar e interpretar resultados de espectrometría de masas de los hidrolizados (MALDI-TOF) empleando herramientas bioinformáticas.
- Realizar el análisis bioinformático de las principales proteínas del lactosuero bovino.
- Determinar presencia de actividad antimicrobiana, inhibitoria de la ECA y antioxidante en los hidrolizados.

# *INTRODUCCIÓN*

## 1. PROTEASAS Y SU CLASIFICACIÓN

Las enzimas que desempeñan un rol central en la degradación de las proteínas han sido conocidas tradicionalmente como *proteasas* o *proteinasas*, términos equivalentes al de enzimas *proteolíticas* o *peptidasas*. Estas se unen al sustrato apropiado a través de los denominados sitios activos para luego catalizar la hidrólisis de la unión peptídica específica (Mc Donald, 1985). Las peptidasas son necesarias para la supervivencia de todos los seres vivos y son codificadas aproximadamente por el 2% de los genes en los organismos de todos los reinos. Se estima que el 14% de las 500 peptidasas humanas están bajo investigación con fines farmacológicos. Las peptidasas son entonces un grupo excepcionalmente importante de enzimas en campos como la biología, medicina y biotecnología (Rawlings *et al.*, 2012).

Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las *endopeptidasas* y las *exopeptidasas*, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína que actúa como sustrato, o que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino, respectivamente (Barret, 2001).

### 1.1. CLASIFICACIÓN

Las proteasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad por el sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley (1960) a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, diferenciando así cuatro grupos: **serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas**. Cada una de las clases de proteasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aún así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato, como las serínicas y cisteínicas, y las que no lo hacen, como las aspárticas y metalopeptidasas. Estos dos grandes grupos son catalíticamente muy diferentes ya que en las peptidasas serínicas y cisteínicas el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina o cisteína, respectivamente), mientras que para las aspárticas y metalopeptidasas es una molécula de agua activada.

El aporte inicial de Hartley (1960) al ordenamiento de las enzimas proteolíticas contribuyó al establecimiento de los dos sistemas actuales de clasificación y nomenclatura de peptidasas: el de la Comisión de Enzimas y el sistema MEROPS (Caffini *et al.*, 2009). La Comisión de Enzimas en 1961 asignó un código numérico a los distintos tipos de

enzimas, agrupándolas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferreras (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6). Las hidrolasas (clase 3) son un conjunto de enzimas que normalmente actúan sobre macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos) o moléculas de menor complejidad. La acción catalítica se expresa en la escisión de diferentes enlaces con la participación de una molécula de agua. El hidrógeno y el oxidrilo resultantes de la hidrólisis se unen respectivamente a las dos moléculas obtenidas por la ruptura del enlace escindido (Barret, 2001).

La subclase 3.4 incluye a las peptidasas y estas se pueden clasificar en dos grandes grupos: las *exopeptidasas* y las *endopeptidasas*. Las primeras actúan únicamente sobre los extremos de la cadena polipeptídica; aminopeptidasas (atacan el extremo N-terminal) y carboxipeptidasas (actúan sobre el extremo C-terminal). Estas últimas a su vez se agrupan en sub-subclases sobre la base de sus mecanismos catalíticos en carboxipeptidasas serínicas (EC 3.4.16), cisteínicas (EC 3.4.18) y metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17).

Las endopeptidasas hidrolizan uniones internas en las cadenas polipeptídicas. En el sistema EC las endopeptidasas son divididas en sub-subclases en función de su mecanismo catalítico, tal como lo propusiera originalmente Hartley (1960). Así, las endopeptidasas serínicas (EC 3.4.21) poseen un residuo serina en el sitio activo, las endopeptidasas cisteínicas (EC 3.4.22) exhiben un residuo cisteína y las aspárticas (EC 3.4.23) un residuo aspártico (frecuentemente dos); por su parte las metalopeptidasas requieren de la presencia de un ion metálico, frecuentemente  $Zn^{+2}$  (Rawlings & Barret, 2004).

Según el sistema *MEROPS* las peptidasas se clasifican de acuerdo a las similitudes de su estructura tridimensional y sus relaciones evolutivas en clanes y familias. Este sistema incluye familias de peptidasas de 6 tipos catalíticos: aspárticas, cisteínicas, glutámicas, metalopeptidasas, serínicas y treonínicas, además de una familia transitoria donde se incluyen aquellas peptidasas de mecanismo catalítico aún desconocido (Caffini *et al.*, 2009).

## 2. APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS PROTEASAS

Las enzimas presentan numerosas ventajas cuando se las usa como agentes biológicos en procesos tecnológicos: especificidad, operación en condiciones fácilmente controlables y biodegradabilidad. De un modo general, los tratamientos enzimáticos

disminuyen la carga contaminante de los efluentes industriales (Muñoz de Malajovich, 2006). La utilización de enzimas en procesos biotecnológicos no es solo una costumbre actual, ya que comenzó mucho tiempo antes que se comprendiera lo que sucedía a nivel molecular: en el año 6000 a.C. los babilonios consiguieron fabricar cerveza por primera vez utilizando células de levadura que transforman el azúcar en alcohol y ya en el año 4000 a.C. los egipcios aprendieron a utilizar la levadura para fabricar pan. Con el correr del tiempo, el avance de la ciencia y la tecnología facilitó la subsecuente utilización de aislados enzimáticos para propósitos industriales específicos. La Tabla 1 muestra los primeros productos enzimáticos que salieron al mercado en el siglo pasado (Uhlig, 1998).

Productor	Año	Proceso o producto comercial
<b>Taakmine</b>	1894	Mezcla de carbohidratos y proteasas proveniente de una preparación de hongos
<b>Boiding</b>	1895	Proceso de manufactura de alcohol por fermentación a partir de la sacarificación de polisacáridos de cereales (amiloproceso)
<b>Röhm</b>	1907	Utilización de enzimas pancreáticas en la manufactura de cueros y en el degomado de la seda cruda
<b>Röhm</b>	1913	Empleo de enzimas pancreáticas en detergentes
<b>Jaag</b>	1959	Desarrollo de un detergente con proteasas de <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Wallerstein</b>	1911	Uso de papaína para estabilizar la cerveza
<b>Röhm y Haas</b>	1917	Empleo de proteasas fúngicas de cultivos semisólidos en manufactura de cueros
<b>Underkofler</b>	1958	Publicación de una lista comercial de algunas enzimas industriales disponibles en el mercado
<b>Novo Nordisk</b>	1960	Uso de proteasa alcalina bacteriana como detergente

**Tabla 1.** Desarrollo histórico de procesos enzimáticos industriales.

De las 25000 enzimas que, según las estimaciones, existirían en la naturaleza, sólo unas 2800 están clasificadas hasta el momento y sólo 400 se comercializan. El mercado se distribuye fuertemente entre las proteasas (59%), las carbohidrasas (28%) y las lipasas (3%), tres grandes conjuntos de enzimas que se emplean en diversas industrias; el 10% restante del mercado corresponde a las enzimas analíticas y farmacéuticas. (Muñoz de

Malajovich, 2006). Como puede observarse, a nivel industrial, las enzimas proteolíticas representan la categoría más importante, abarcando sectores tan relevantes como la industria de alimentos y bebidas, de detergentes, textil, curtiembre y farmacéutica. Dentro de estas categorías las proteasas de origen animal y vegetal representan en su conjunto el 15% del mercado de enzimas proteolíticas, siendo no obstante mayoritarias las de origen microbiano (Nielsen *et al.*, 2002).

### 2.1. FITOPROTEASAS

El uso de enzimas provenientes de fuentes vegetales se ha incrementado gracias al renovado interés en la aplicación de procesos enzimáticos pertenecientes a la *Química Verde*, es decir, y es respetuosa de la ecología y el medio ambiente. Sin embargo, el número de proteasas vegetales aisladas y caracterizadas es aún muy bajo, ya que hasta la fecha se han estudiado menos del 1% de las especies vegetales conocidas (Vallés *et al.*, 2009).

No obstante el campo de aplicación de las proteasas vegetales es muy amplio y abarca industrias tan diversas como la alimentaria, detergentes, textil, cueros, química y farmacéutica. En la Tabla 2 se detallan algunos de los procesos más relevantes.

Industria	Producto	Enzima/s	Actividad
Alimentaria	Cerveza	Papaína	Hidrólisis de proteínas insolubles que afectan el sabor y la estabilidad de la espuma.
Alimentaria	Quesos	Preparaciones enzimáticas obtenidas de la Familia <i>Astraceae</i> y de <i>Cynara cardunculus</i> .	Coagulación de la caseína.
Detergentes	Jabón en polvo, detergentes de uso doméstico e industriales	Proteasas varias	Hidrólisis de proteínas a polipéptidos solubles o aminoácidos libres. En conjunto con tensioactivos logran eliminar manchas difíciles.
Farmacéutica	Tratamientos para desórdenes reumáticos	Combinación de Papaína, Bromelaína, Tripsina y Quimotripsina.	Actúan a través de mecanismos que aún no se conocen.

**Tabla 2.** Ejemplos de aplicaciones de proteasas vegetales.

### 3. *HIERONYMAÍNA Y POMIFERINA*

**Hieronymaína** es el nombre del preparado enzimático obtenido a partir de los frutos de la especie *Bromelia hieronymi* Mez o “chaguar” (Figura 1), perteneciente a la familia *Bromeliaceae*. Esta especie se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta el noreste de Argentina, en los campos de vegetación xerófila (adaptada a la vida en un medio seco o ambientes secos), sus bayas son fusiformes y fibrosas, de aproximadamente 5x2 cm (Natalucci *et al.*, 1985). Este preparado enzimático presenta máxima actividad caseinolítica a pH 7,3 y 10,7 y está compuesto por tres peptidasas cisteínicas principales: *Hieronymaína I* (Bruno *et al.*, 2003), cuya masa molecular es de 24066 Da, *Hieronymaína II* (Bruno *et al.*, 2006), de masa 23411 Da y la *Hieronymaína III* (Bruno *et al.*, 2008), cuya masa es 23112 Da. Estas peptidasas presentan diferencias de especificidad frente a la unión peptídica a clivar y esto aumenta la importancia de su utilización como herramientas biotecnológicas.



**Figura 1.** Plantas de *Bromelia hieronymi*.

**Pomiferina** es el nombre que se le asignó al conjunto de proteasas obtenidas a partir del látex de frutos maduros de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid., o “naranja de Luisiana”, una especie de la familia *Moraceae* cultivada en toda la región templado-cálida de nuestro país, que se emplea para formar cercos vivos y también con fines ornamentales. El fruto es un sincarpio esférico, rugoso, verde-amarillento, de 10 a 15 cm de diámetro que contiene en su superficie a los conductos laticíferos (López *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos al ensayar *pomiferina* frente a diferentes activadores e

inhibidores han permitido establecer que esta preparación contiene fitoproteasas de tipo serínico que no son calcio dependientes. La variación de la actividad proteolítica en función del pH es similar a la que muestran la mayoría de las proteinasas serínicas, que poseen máxima actividad a pH alcalino; a valores de pH entre 9,3 y 10,3 se manifiesta una actividad caseinolítica relativa superior al 90%. Las preparaciones crudas de dicha enzima clivan con mayor frecuencia uniones peptídicas en las que el aminoácido que aporta el grupo carboxilo es de naturaleza no polar y/o de pequeño tamaño, como Ala, Gly y Leu y en menor grado Phe y Val. Se han caracterizado cuatro proteasas a partir de preparaciones crudas obtenidas del látex de *M. pomifera*. Dos fracciones de actividad minoritaria llamadas I y II de 71200 y 62700 Da respectivamente y dos de actividad mayoritaria, llamadas III y IV, con masas moleculares de 69700 y 69900 Da respectivamente. Estas últimas representan el 77% de la actividad recuperada y poseen mayores actividades específicas (López *et al.*, 1993).



Figura 2. Planta de Maclura pomifera y su fruto.

#### 4. LACTOSUERO BOVINO

La leche contiene entre 30 - 35 g/l de proteína total de alta calidad nutritiva. Estas se pueden clasificar en caseínas y proteínas del lactosuero. Debido a las características particulares de las caseínas y del complejo micelar que forman, las proteínas de la leche pueden separarse fácilmente por varios métodos en las fracciones antes citadas. Uno de los mecanismos históricamente utilizados para tal fin es la coagulación con cuajo, que constituye la base para la fabricación de muchos productos lácteos, entre ellos el queso.

Sintéticamente la coagulación de la leche se produce debido al ataque de la quimosina proveniente del cuajo, sobre las  $\kappa$ -caseínas presentes en la superficie de la micela, esto genera un aumento de su hidrofobicidad, que la desestabiliza y aumenta su tendencia a unirse a otras micelas. De esta manera se forma un coagulo de caseínas que precipita (y es madurado para obtener un producto) y una fracción acuosa que contiene a las proteínas lácteas que no precipitaron (Walsh, 2002).

Para la producción de un kilo de queso se emplean alrededor de diez litros de leche, lo que genera aproximadamente nueve kilos de suero como subproducto. Este contiene 6 g/l de proteínas con excelentes propiedades funcionales tales como; solubilidad, hidratación, textura, consistencia, formación de espuma, emulsificación y propiedades de gelificación (Spellman *et al.*, 2009; Nicorescu *et al.*, 2009). Además de un valor nutritivo elevado debido a su excepcional contenido en lisina, triptofano y aminoácidos azufrados (Engler, 2003). Las proteínas del suero (se detallan en la Tabla 3) representan el 16,8% del total de proteínas lácteas (Taverna, 2002). Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3,5 Kg. de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 Kg. de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 Kg. de lactosuero líquido por lo que se lo considera como un potencial contaminante ambiental (Correa, 2010).

Proteínas del lactosuero	Valor relativo (%)
$\beta$ - lactoglobulina	51
$\alpha$ - lactoalbúmina	22
Seroalbúmina	5
Globulinas inmunes	12
Proteasa-peptona (glicoproteínas de tamaño intermedio entre proteína y péptido)	10

**Tabla 3.** Composición proteica del lactosuero (Alais, 1985).

Anteriormente el lactosuero era considerado un producto de desecho. Luego fue utilizado para alimentación de animales, elaboración de ricota y actualmente es incorporado a formulaciones alimentarias para el hombre, por su alta calidad proteica (Grasselli *et al.*, 1997). Se estima que en la república Argentina se producen 450000 toneladas de suero líquido por año, de los cuales, el 62% es utilizado directamente en alimentación animal, el 33% se emplea en la elaboración de derivados (concentrados

proteicos), el 4% se transforma en suero en polvo y el 1% es tratado como efluente (Engler, 2003). Estos datos dan una pauta acerca de la oportunidad existente, que ha cobrado mucho interés en los últimos años, por generar valor agregado a un producto de escaso valor comercial y que además es contaminante para el medio ambiente.

#### *4.1. Características de las proteínas del suero.*

Las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la  $\alpha$ -lactoalbúmina, la  $\beta$ -lactoglobulina y la lactoferrina, o bien de transferencia sanguínea, como la sero-albúmina y las inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas:  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina (Correa, 2010), que se explicarán con más detalle.

La  $\alpha$ -lactoalbúmina es la segunda proteína en concentración en el lactosuero bovino (entre 1 y 1,5 mg/ml). Esta formada por una sola cadena polipeptídica, de 123 aminoácidos, con un peso molecular de unos 14200 Da. Su estructura terciaria, globular y muy compacta, es mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice  $\alpha$  y otra de hojas plegadas  $\beta$ . Es una proteína ácida con un punto isoeléctrico de alrededor de 4,8. En la vaca existen dos variantes genéticas, con distribución desigual según las razas. Desde el punto de vista nutricional es importante dada la abundancia de triptófano (4 residuos por molécula), lo que representa un 6% en peso. La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una de las proteínas de la leche que pueden causar alergia siendo la zona más alergénica la situada entre la valina de la posición 42 y el glutámico de la posición 49 (Farrell *et al.*, 2004).

La  $\beta$ -lactoglobulina, alcanza concentraciones de 2 a 4 mg/ml en el lactosuero bovino, está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de unos 18400 Da. Existen diversas variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene una valina en la posición 118 y un aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina en esas posiciones, respectivamente (Medrano & Aguilar, 1990). Al pH de la leche, la  $\beta$ -lactoglobulina de los rumiantes se presenta en forma de dímeros con los monómeros unidos de forma no covalente. Estos dímeros se forman entre pH 7,5 y pH 5,2, el punto isoeléctrico de la  $\beta$ -lactoglobulina. Por encima de pH 7,5 y por debajo de pH 3,5 se presenta en forma de monómeros, mientras que entre pH 5,2 y pH 3,5 se encuentra en forma de octámeros. La estructura terciaria de los monómeros se mantiene gracias a dos puentes disulfuro. También existe un grupo tiol libre, el correspondiente a la cisteína que

ocupa el lugar 121 en la secuencia. Este tiol es muy importante en la asociación con otras moléculas, especialmente con la k-caseína, lo cual tiene una gran influencia en la coagulación de la leche inducida por la quimosina. La  $\beta$ -lactoglobulina es la más hidrofóbica de las proteínas comunes del lactosuero y por lo tanto es capaz de interactuar con distintas moléculas hidrofóbicas, especialmente el retinol y los ácidos grasos. Esta característica también le otorga propiedades emulsionantes (Gil Zamora, 2007).

La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre y procede de ella. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos y un peso de 66382 Da. En el lactosuero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,4 mg/ml.

Las inmunoglobulinas forman parte del sistema de defensa. La estructura básica, en forma de "Y", está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas glicosiladas, unidas por puentes disulfuro. En la leche bovina, aproximadamente el 80% de la inmunoglobulinas son IgG. La concentración de estas proteínas es de entre 0,4 y 1 mg/ml (Calvo, 2009).

La lactoferrina es una proteína monomérica, no hemica, fijadora de hierro, de 80000 Da, emparentada estructuralmente con la transferrina de la sangre y con la ovotransferrina del huevo. Es una glicoproteína (proteasa-peptona) formada por dos lóbulos unidos por una hélice de tres vueltas. Como estructura secundaria, domina la hélice alfa. Tiene carácter básico, con un punto isoeléctrico próximo a 9. La afinidad de la lactoferrina por el hierro es muy grande, siendo la constante de afinidad del orden de  $10^{20}$  M<sup>-1</sup>. Los puntos de unión están localizados en posiciones equivalentes en ambos lóbulos. La unión del hierro es reversible y tiene lugar en presencia de un ión carbonato o bicarbonato por cada ión férrico, haciéndolo indisponible para las bacterias y para la formación de radicales libres en las reacciones de oxidación (Drago Serrano, 2006; Gil Zamora, 2007).

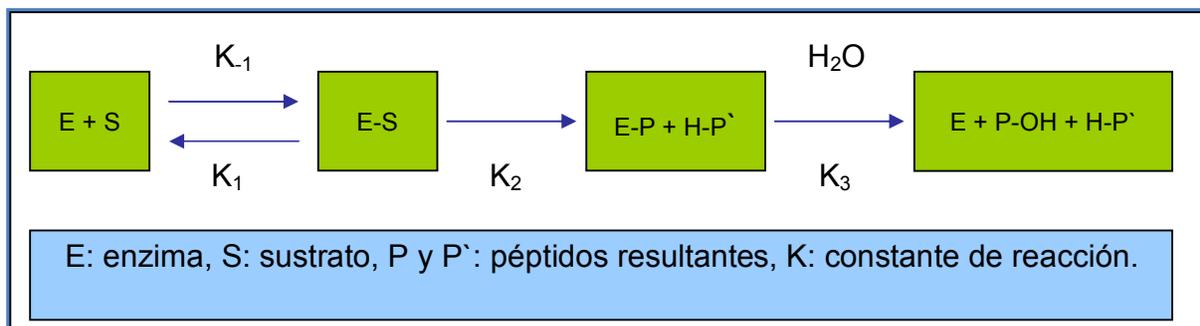
## *5. HIDROLIZADOS PROTEICOS Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS.*

La hidrólisis proteica se observa en diversos procesos tales como la digestión mediada por la acción de proteasas como pepsina, tripsina o quimiotripsina, que se produce en el estomago e intestino. También se encuentra presente durante el procesamiento y fabricación de ciertos alimentos como por ejemplo los quesos y el jamón. Un tercer tipo de proceso es la producción de hidrolizados proteicos generados por la

acción externa y aislada de enzimas. En este caso la materia prima original, por lo común un aislado o concentrado proteico, es transformado en otro producto, un hidrolizado proteico, por la acción de proteasas externas que no proceden de microorganismos endógenos (Millán & Vioque, 2005). En estos hidrolizados se potencian diversas características tales como propiedades funcionales (viscosidad baja, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad), retardo en el deterioro, calidad nutricional, prevención de interacciones indeseadas, aparición de péptidos o aminoácidos libres, que les conceden ventajas con respecto a las proteínas originales, para su utilización en productos alimenticios.

La hidrólisis proteolítica se desarrolla a través de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo cual le da a este tipo de procesos una gran complejidad. Se propone un mecanismo para el proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas: primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), en segundo lugar la ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. Estos tres pasos se representan en la Figura 3 (Benitez *et al.*, 2008).

Una propiedad fundamental de los hidrolizados es su grado de hidrólisis, que se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original y que está determinado por ciertos parámetros experimentales como la concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura. Otro factor determinante es la naturaleza de la actividad de la enzima, es decir, su actividad específica y tipo de actividad (Nielsen *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Mecanismo catalítico de una proteasa.

Los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1% y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales; hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como saborizantes y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Benitez *et al.*, 2008). Esta información se resume en la Tabla 4.

Tipo de Hidrolizado	Grado de hidrólisis (%)	Aplicación
<b>Limitado (con bajo grado de hidrólisis)</b>	1 - 10	Mejora de las propiedades funcionales.
<b>Variable</b>	Variable	Mejora del flavor.
<b>Extensivo (alto grado de hidrólisis)</b>	> 10	Suplemento proteico. En alimentación especializada (dietas médicas).

**Tabla 4.** Hidrolizados y sus aplicaciones (Millán & Vioque, 2005).

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre dos y veinticinco residuos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado previo del mismo, como por ejemplo mediante hidrólisis enzimática, ejerciendo diversos efectos beneficiosos para la salud (Vioque *et al.*, 2006). La actividad de estos péptidos se debe básicamente a la composición aminoacídica inherente y a su secuencia lo cual condiciona y determina su estructura tridimensional. Dependiendo de la actividad biológica ejercida, se observan entre los diversos grupos de péptidos bioactivos características fisicoquímicas y estructurales similares.

Como ya se mencionó, estas secuencias inactivas dentro de las proteínas pueden obtenerse de tres maneras; por hidrólisis enzimática de las proteasas digestivas (digestión con pepsina y enzimas pancreáticas), procesamiento del alimento (calor, tratamiento ácido o alcalino) y proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos o plantas (Haque & Rattan, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido encontrados principalmente en las proteínas de la leche y en derivados de esta como quesos o yogurts. Pero también se ha observado su existencia en otras proteínas animales, pescados y diversos vegetales como soja, arroz o garbanzo e incluso hongos (Vioque & Millán, 2005).

Como se ha mencionado las proteínas de la leche son una rica fuente de péptidos con diversas actividades biológicas. Aunque la mayoría de las investigaciones se han dirigido a la fracción caseínica, las proteínas componentes del suero bovino son una excelente fuente y con mucho potencial por explotar. Dentro de las funciones más comunes encontradas en péptidos derivados del lactosuero se destacan:

- **Opioide.** Receptores opioides, localizados en los sistemas endócrino y nervioso y en el tracto digestivo de mamíferos, están vinculados con el control de la motilidad intestinal, comportamiento emocional, analgesia y saciedad. Dichos receptores interactúan con ligandos endógenos (endorfinas) o exógenos (exorfinas) conocidos como péptidos opioides, los cuales tienen actividades agonísticas o antagonísticas; todos ellos tienen en común la presencia de un residuo Tyr en la posición N-terminal, junto con la presencia de otro residuo aromático, como Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición (Alvarado & Guerra, 2010).
- **Inmunomoduladora.** Estos péptidos pueden modular la respuesta inmunológica estimulando la fagocitosis en macrófagos y la proliferación de linfocitos. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la acción de estos péptidos, una de ellas propone la estimulación de la proliferación y maduración de células T y otras células fagocíticas para la defensa contra infecciones. Se ha demostrado que varios componentes lácteos modulan la proliferación *in vitro* de linfocitos, por ejemplo, la lactoferrina B promueve la actividad fagocítica de los neutrófilos humanos; pequeños péptidos derivados del extremo N-terminal de la  $\alpha$ -lactalbúmina bovina aumentan significativamente la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos humanos (Alvarado & Guerra, 2010).
- **Transportadora de Calcio.** Se han identificado varios fosfopéptidos derivados de la caseína que contienen la secuencia –Ser(P)–Ser(P)–Ser(P)–Glu–Glu. Estos caseinofosfopéptidos son liberados por proteólisis y juegan un papel preponderante en la absorción de calcio en el intestino delgado y su presencia en la cavidad oral promueve la remineralización del esmalte dental (Torres-Llanéz *et al.*, 2005).
- **Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).** Los péptidos antihipertensivos inhiben a la ECA (peptidildipeptidasa hidrolasa). La ECA es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro). Esta enzima puede incrementar la presión sanguínea al convertir angiotensina I (decapéptido) en un potente octapéptido vasoconstrictor, llamado angiotensina II (Basso *et al.*, 2005).

Se ha descrito que las proteínas séricas  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina e hidrolizados del suero obtenidos con pepsina, tripsina y quimotripsina, contienen péptidos con acción inhibitoria de ECA. Los péptidos que muestran actividad antihipertensiva están formados por Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro (Torres-Llanéz *et al.*, 2005).

- **Antimicrobiana.** Los péptidos antimicrobianos fueron descubiertos en 1950 cuando se aisló la nisina a partir bacterias ácido lácticas y desde entonces el número de péptidos antimicrobianos registrados ha crecido constantemente. Estos péptidos presentaron una solución prometedora al problema de la resistencia a los antibióticos porque contrariamente a los antimicrobianos tradicionales, no se unen a sitios diana específicos y además la rápida destrucción de las membranas que provocan deja sin tiempo a las bacterias de multiplicarse y mutar. El mecanismo de acción parece estar dirigido hacia varios objetivos, siendo la membrana plasmática el más común (Tiwari *et al.*, 2009). De esta manera las propiedades bactericidas están correlacionadas con la carga positiva neta de los péptidos y con su estructura anfipática, lo cual les permite interactuar directamente con la membrana, creando canales que dan lugar a la filtración de los componentes celulares vitales.
- **Antioxidante.** Existen muchas moléculas reactivas al oxígeno que se producen en las reacciones metabólicas y dañan las biomoléculas, provocando el desarrollo de enfermedades y acrecentando los efectos del envejecimiento. Así, la presencia de radicales libres contribuye a la generación de más de cien desórdenes en humanos, incluyendo aterosclerosis, artritis, isquemia e injuria en diversos tejidos, daño en el sistema nervioso central y enfermedades respiratorias, entre otros (Bhalodi *et al.*, 2008). Se han estudiado hidrolizados de proteínas alimentarias de diversas fuentes con el propósito de hallar péptidos con actividad antioxidante. Los resultados fueron positivos en hidrolizados de proteínas lácteas (Kitts & Weiler, 2003), por ejemplo, péptidos provenientes de proteínas de lactosuero obtenidos empleando proteasa F, una endoproteasa y exopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (Peña-Ramos & Xiong, 2001).

En la Tabla 5 se resumen algunos ejemplos de péptidos con actividad biológica de diversas fuentes naturales.

Función	Nombre del/los Péptido/s	Fuente	Efecto beneficioso
Opioides	$\beta$ -Casomorfina Exorfinas $\alpha$ -Lactorfinas $\beta$ -Lactorfinas	$\beta$ -Caseína $\alpha$ -Caseína $\alpha$ -Lactoglobulina $\beta$ -Lactoglobulina	Regulan el tránsito intestinal Mejoran la digestión y absorción.
Inmunomoduladores	Lactoferrina B -	$\alpha$ -Lactoalbúmina $\kappa$ -Caseína	Estimulan la respuesta inmune.
Transportadores de iones	Caseinofosfopéptidos	Caseínas	Mejoran la absorción de minerales y metales.
Antitrombóticos	-	$\kappa$ -Caseína	Actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas y de la unión de la cadena y del fibrinógeno a receptores específicos de la plaqueta.
Antihipertensivos	Casoquininas	Proteínas de leche ( $\beta$ -Lactoglobulina $\alpha$ -Lactoalbúmina), pescado y levaduras	Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina. Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
Antioxidantes	-	Hidrolizados proteicos de lactosuero, caseínas, frijoles.	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento al inhibir los daños causados por la oxidación lipídica generada por radicales libres.
Antimicrobianos	Lactoferrina Caseidina Pleurocidina	Lactoferrina Caseínas y $\alpha$ -Lactoalbúmina Piel de la membrana mucosa de <i>Pleuronectes americanus</i>	Reducen el riesgo de infecciones, inhibiendo el crecimiento microbiano o por acción bactericida.

**Tabla 5.** Péptidos bioactivos y sus efectos.

*MATERIALES*  
*y*  
*MÉTODOS*

SECCIÓN A: ANÁLISIS DE SUEROS OBTENIDOS POR COAGULACIÓN  
ENZIMÁTICA DE LECHE TRATADA CON QUIMOSINA,  
HIERONYMAINA Y POMIFERINA

1. MATERIAL VEGETAL

1.1. Frutos de *Maclura pomífera*.

*Maclura pomífera* (Raf.) Schneid (Moraceae), es un árbol dioico, de mediano tamaño, originario de América boreal. A partir del látex de sus frutos, descritos en la introducción, se obtuvo una preparación proteolíticamente activa denominada Pomiferina. Los mismos fueron recolectados en la ciudad de La Plata, Argentina, en abril de 2009 y marzo de 2010.

1.2. Frutos de *Bromelia hieronymi*.

*Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae), es una planta estolonífera que forma matorrales y posee filodios enhiestos, glaucos, de punta prolongada y esclerosada, con los bordes armados de aguijones negros y curvos. Sus frutos, descritos en la introducción, fueron utilizados para la obtención de un extracto proteolíticamente activo denominado Hieronymaína. Los mismos provenían de Santiago del Estero, Argentina y fueron colectados en abril de 2008.

2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO (EC)

2. 1. Pomiferina.

Practicando incisiones longitudinales de 2 mm de profundidad en frutos maduros de *M. pomífera* se obtuvo el látex, que fue colectado sobre 50 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,6 conteniendo EDTA 5mM, en baño de hielo para detener toda actividad enzimática. El EDTA se utiliza como protector ya que compleja cationes y evita que se oxiden los polifenoles que inactivan proteínas. Las preparaciones crudas se obtuvieron diluyendo hasta 80 ml con agua la suspensión anterior y centrifugando a 4°C y 16000 g durante 20 min. Luego de eliminar una película blanquecina supernadante y un pellet amarillo verdoso (lo que permitió la remoción de gomas y otros materiales insolubles), la solución se filtró a través de papel y finalmente fue fraccionada y almacenada a -20°C. Se obtuvo

una relación de 25 ml extractivo por cada ml de látex.

### *2. 2. Hieronymaína.*

50 g de frutos congelados de *B. hieronymi* fueron cortados en rodajas y triturados en 250 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM como agentes protectores. El extractivo se filtró a través de gasa y se centrifugó a 16000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante o extracto crudo (Hieronymaína) se fraccionó y se conservó a -20 °C.

### *2.3. Preparación de suspensiones de Bromelina y de Quimosina.*

La Bromelina es una preparación proteolíticamente activa que se obtiene comercialmente a partir de frutos de *Ananas comosus*. Se pesaron 0,02 g de bromelina liofilizada (5,1 Unidades/mg, B4882-Sigma) y se disolvieron en 10 ml de buffer fosfatos 0,1 M pH 6,0. La suspensión fue fraccionada y almacenada a -20 °C. Se preparó un stock de Quimosina (CHY-MAX, 2028 IMCUg, Hansen) de 50 IMCU/ml (IMCU=International Milk Clotting Unit).

## *3. PURIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS CRUDOS POR PRECIPITACIÓN ETANÓLICA FRACCIONADA.*

Mediante esta técnica se eliminan los compuestos fenólicos, glúcidos y otros compuestos solubles, intentando conservar la máxima actividad enzimática posible respecto del extracto crudo. En el caso de Pomiferina, se buscó determinar el volumen mínimo de solvente necesario para tal fin, ya que no se tienen datos bibliográficos.

### *3. 1. Pomiferina*

Se colocaron seis alícuotas de 20 ml del extracto crudo en tubos Falcon y se agregó a cada uno de ellos distintos volúmenes de etanol preenfriado a -20 °C durante 30 min (uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis volúmenes). Se llevaron al freezer por 30 min a -20 °C y luego se centrifugaron a 16000 g por igual cantidad de tiempo, a una temperatura de 4 °C. Se descartó el sobrenadante; los tubos se colocaron boca abajo sobre papel absorbente hasta eliminar los restos de líquido y luego se evaporaron los restos de solvente empleando una bomba de vacío. Los precipitados se resuspendieron en 20 ml de buffer fosfato 0,1 M, pH 6,6 con EDTA 5 mM, trabajando en baño de hielo. Los extractos

parcialmente purificados se fraccionaron en tubos Eppendorf, se almacenaron a -20 °C y fueron denominados Precipitados Etanólicos Redisueltos (PER).

### *3. 2. Hieronymaína*

Se tomó una alícuota de 20 ml de extracto crudo y se realizó una precipitación con cuatro volúmenes de etanol, de acuerdo a lo indicado en la bibliografía (Bruno *et. al.*, 2002), siguiendo la metodología empleada en el ítem anterior.

## *4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS*

La determinación de la concentración de proteínas de los EC y de los PER, se realizó por el macrométodo de Bradford (1976). Este se basa en el corrimiento del máximo de absorbancia del colorante Coomassie Blue G-250, desde 465 nm (forma roja) correspondiente al colorante libre, hacia 595 nm (forma azul) del complejo colorante-proteína. Este método es útil para detectar proteínas en el rango de concentraciones de 100 a 1000 µg/ml.

Para llevar a cabo este ensayo, 50 µl de muestra se mezclaron con 2,5 ml del reactivo de Bradford (Bradford 1976), se agitó por unos segundos utilizando un vórtex y luego de diez min se midió la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina, en el rango de concentraciones antes mencionado. Todas las medidas se realizaron por triplicado y como blanco se utilizó agua destilada en lugar de muestra.

## *5. ENSAYO DE ACTIVIDAD CASEINOLÍTICA*

Este ensayo se realizó para determinar y comparar la actividad proteolítica del EC y del PER de cada enzima. En el caso de Pomiferina, el ensayo se realizó para cada uno de los precipitados obtenidos en el ítem 3.1, con la finalidad de averiguar con cual se consigue recuperar la mayor actividad.

Se preparó una solución de caseína 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0, se calentó a ebullición durante 20 min y se filtró en caliente utilizando papel de filtro. Una vez frío se agregó cisteína suficiente para lograr una concentración final de 15 mM y se ajustó el pH para que se mantenga en 8. La mezcla de reacción se preparó agregando 1,1 ml de solución de caseína a 0,1 ml de solución de EC ó PER. El ensayo se llevó a cabo en un baño termostático a 37 °C durante 2 min. La reacción se detuvo con ácido

tricloroacético (TCA) 5%. Luego los tubos se colocaron en heladera durante 30 min, se centrifugaron a 16000 g por el mismo tiempo y se midió la absorbancia a 280 nm.

Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción pero se agregó TCA 5% desde el inicio, antes de colocar la enzima para inactivarla antes de contactarse con el sustrato. Todas las pruebas se hicieron por triplicado, incluyendo los blancos. Se trabajó con una dilución 1/6 del EC y el PER de Hieronymaína y en el caso del EC y PER de Pomiferina la dilución fue 1/15.

Las unidades caseinolíticas por ml (Ucas/ml) se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

Ucas/ml = (Abs. promedio de la muestra – Abs. promedio del blanco) x 10 x D / tiempo (min)

D: factor de dilución de la muestra.

## *6. ENSAYOS DE COAGULACIÓN*

Se evaluó la actividad coagulante de la leche del EC de Pomiferina para determinar los parámetros óptimos de este proceso. Para tal fin se preparó una solución de leche descremada al 12% (San Regim) en solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La mezcla de reacción consistió en 1 ml de leche y 0,1 ml de muestra enzimática sin diluir o en distintas diluciones. Este ensayo se realizó colocando cada tubo de reacción, conteniendo el volumen de leche indicado, en un baño termostático a 25 °C. Luego se agregó la muestra enzimática correspondiente y se cronometró el tiempo hasta la aparición de un coagulo firme. Se repitió el procedimiento a diferentes temperaturas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## *7. PREPARACIÓN DE LACTOSUERO*

Se realizaron distintos ensayos sobre sueros obtenidos por coagulación de leche, utilizando los EC de Pomiferina y Hieronymaína. La coagulación se realizó en cada caso con 50 ml de una suspensión de leche en polvo (San Regim) al 12% p/v en CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 6,0 y una temperatura de 35 °C. Se adicionó una cantidad suficiente de cada preparación enzimática para provocar una coagulación masiva a los 40 min. Luego, los coágulos se dejaron en reposo durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente fueron cortados con espátula en pequeños cubos de arista menor a 0,3 cm aproximadamente y centrifugados durante 15 min a 16000 g. Los sueros exudados fueron ultra filtrados utilizando tubos Amicon Ultra Millipore, con una membrana de corte de 5

kDa, fraccionados y almacenados a -20 °C.

### 7.1. Electroforesis de los sueros

Tanto los sueros filtrados (fracción  $\leq$  5 kDa) como los que no fueron filtrados se analizaron para determinar su perfil proteico.

Se realizó una electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Shägger & Von Jagow, 1987) con un gel de stacking, un gel separador y un gel de resolución. La composición de los geles se detalla en las Tablas 6 y 7. Esta técnica permite resolver adecuadamente la mezcla de péptidos obtenidos. Las muestras se prepararon agregando un volumen de buffer de muestra (Tabla 8) a un volumen de suero. Luego se calentaron a ebullición durante 5 min y centrifugaron a 16000 g. Además de los sueros mencionados, se sembró suero obtenido por coagulación con Quimosina, con Bromelina y leche entera. Cada preparado se aplicó en su correspondiente calle en el gel con jeringa Hamilton (volumen de siembra 4,5  $\mu$ l) y se utilizó una celda Miniprotean III (Bio – Rad) en cuyos reservorios anódico y catódico se colocaron los correspondientes sistemas buffer (Tablas 9 y 10). Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V / 70 mA) durante el apilamiento y cuando las proteínas ingresaron al gel de separación se aumentó el voltaje hasta 90 V (90 mA). Este valor se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis. Los geles se fijaron durante 30 min con solución fijadora (Tabla 11) y luego fueron sumergidos durante 2 h en solución colorante (Tabla 12). Posteriormente se lavaron con solución decolorante (Tabla 13) hasta la obtención de un fondo incoloro. Los geles fueron escaneados y los perfiles peptídicos analizados por densitografía empleando el software Scion Image (URL: <http://www.scioncorp.com>) que convierte la intensidad de color de las bandas presentes en los geles en datos numéricos.

Composición de buffers y geles utilizados:

Buffer del gel	
<b>TRIS</b>	36,3 g
<b>SDS (Dodecil sulfato de sodio)</b>	0,3 g
<b>HCl 1 M</b>	Cantidad suficiente para llevar a pH 8,45
<b>Agua destilada</b>	Cantidad suficiente para llevar a 100 ml de volumen final

**Tabla 6.** Composición del Buffer para armar el gel.

Composición del gel			
Reactivos	Gel de apilamiento	Gel espaciador	Gel de resolución
<b>Acril:Bis (49,5% T, 3% C)</b>	0,6 ml	2 ml	3,3 ml
<b>Buffer del gel</b>	1,00 ml	3,3 ml	3,3 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
<b>TEMED</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>PSA 10%</b>	12 µl	12 µl	12 µl

**Tabla 7.** Composición del gel para armar dos placas. %T = (gramos de acrilamida + gramos de bisacrilamida) x 100 / Volumen total y %G = (masa en gramos de bisacrilamida) x 100 / Volumen total.

Buffer de Muestra 2X	
<b>TRIS</b>	1,57 g
<b>SDS (Dodecil sulfato de sodio)</b>	2 g
<b>Mercaptoetanol</b>	5 ml
<b>Glicerol 10%</b>	8 ml
<b>Azul de Bromofenol</b>	2 mg
<b>HCl 1 M</b>	Cantidad suficiente para llevar a pH 6,8
<b>Agua destilada</b>	Cantidad suficiente para llevar a 50 ml de volumen final

**Tabla 8.** Buffer de Muestra.

Buffer anódico	
<b>TRIS</b>	2,42 g
<b>HCl 1 M</b>	Cantidad suficiente para llevar a pH 8,9
<b>Agua destilada</b>	Cantidad suficiente para llevar a 100 ml de volumen final

**Tabla 9.** Composición del buffer anódico.

Buffer catódico	
TRIS 0,1 M	1,21 g
Tricina 0,1 M	1,79 g
HCl 1 M	Cantidad suficiente para llevar a pH 8,9
Agua destilada	Cantidad suficiente para llevar a 100 ml de volumen final

**Tabla 10.** Composición del buffer catódico.

Solución fijadora	
Acido acético glacial	25 ml
Metanol	125 ml
Agua destilada	Cantidad suficiente para llevar a 250 ml de volumen final

**Tabla 11.** Composición de la solución fijadora.

Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie brilliant blue R - 250	100 mg
Agua destilada	Cantidad suficiente para llevar a 100 ml de volumen final

**Tabla 12.** Composición de la solución colorante.

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Agua destilada	Cantidad suficiente para llevar a 100 ml de volumen final

**Tabla 13.** Composición de la solución decolorante.

### *7.2. Determinación de actividad antioxidante*

Se evaluó el poder oxidante de los sueros obtenidos por coagulación de la leche con Pomiferina y Hieronymaína, mediante dos métodos distintos: inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno y reducción del radical estable DPPH.

### 7.2.1. Determinación del poder antioxidante mediante la inhibición de la decoloración del $\beta$ -caroteno

Se utilizó el método de Tepe *et al.* (2005) con modificaciones. Se disolvieron 0,8 mg de  $\beta$ -caroteno en 4 ml de cloroformo, luego se agregaron 80 mg de ácido linoleico y 800 mg de Tween 20. El cloroformo fue eliminado bajo campana a 40 °C. Finalmente, se adicionaron 200 ml de agua saturada con oxígeno, agitando durante 1 min para terminar con la preparación del reactivo. La mezcla de reacción se formuló con 2,5 ml del reactivo y 0,1 ml de muestra (suero, suero filtrado, agua como blanco y estándares de ácido ascórbico entre 0,1 y 0,00001 g/ml) y se llevó a cabo a 50 °C en todos los casos por triplicado. Se determinó la absorbancia a 470 nm ( $A_{470}$ ) a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno, realizando el cociente entre la  $A_{470}$  a tiempo n y la  $A_{470}$  a tiempo cero multiplicado por 100.

### 7.2.2 Evaluación del poder antioxidante mediante la reducción del radical DPPH

Se preparó una solución del reactivo DPPH (difenilpicrilhidracil, un radical liposoluble) en etanol (25  $\mu$ g/ml; Choi *et al.*, 2002). Las muestras (lactosueros) se precipitaron con 3 volúmenes de etanol a -20 °C durante 24 h. Luego de centrifugar a 16000 g durante 30 min se recuperaron los sobrenadantes para realizar las determinaciones. La reacción se llevó a cabo mezclando 0,9 ml del reactivo DPPH con 0,1 ml de cada muestra (M). Se realizaron dos tipos de blancos: un blanco de muestra ( $B_M$ ) con 0,9 ml de etanol y 0,1 ml de reactivo y blancos de reactivo ( $B_R$ ) con 0,9 ml de muestra y 0,1 ml de etanol. Se utilizaron como estándares soluciones de ácido ascórbico de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,001 mg/ml. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente determinando la absorbancia a 517 nm al inicio y a intervalos de tiempo regulares hasta que la medida de absorbancia permaneció constante. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) empleando la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100 \times [1 - (AM - AB_R) / AB_M]$$

donde AM,  $AB_R$  y  $AB_M$  son las medidas de absorbancia a 517 nm de las muestras, blancos de reactivo y blancos de muestra respectivamente.

### *7.3. Ensayo de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina*

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) es una proteasa que actúa incrementando la presión arterial, a través de la hidrólisis del decapeptido Angiotensina I para producir el octapéptido vasoconstrictor Angiotensina II y degradando el péptido vasodilatador Bradiquinina. Debido a esto, es un blanco ideal para el tratamiento de la hipertensión y se ha encontrado cierta actividad inhibitoria en sueros obtenidos por tratamiento de la leche con quimosina.

La actividad anti hipertensiva de las muestras de suero obtenido por coagulación con las enzimas Pomiferina y Hieronymaína, se testeó por su capacidad de inhibir a la ECA in vitro. El ensayo se llevó a cabo utilizando el sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH (Carmona *et. al.*, 2006). La actividad se determinó incubando 3  $\mu$ l de ECA con 2  $\mu$ l de la solución del sustrato en DMSO (0,5 mg/ml) en presencia o ausencia de 25  $\mu$ l de las muestras de suero filtrado y se llevó a un volumen final de 3 ml en una cubeta de cuarzo con buffer Tris-HCl 0,1 mol/l, (pH 7,0), conteniendo 50 mmol/l NaCl y 10 mmol/l de ZnCl<sub>2</sub> a 37 °C. La reacción se realizó en un espectrofluorómetro (modelo RF-1501, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), registrando el incremento de la fluorescencia ( $\lambda$  excitación 320 nm;  $\lambda$  emisión 420 nm) durante 3 min. Se realizó un control empleando 25  $\mu$ l Captopril (1 mmol/l en agua) como inhibidor en lugar de suero y un blanco de la enzima, que consistió en la mezcla de reacción sin ningún tipo de inhibidor. Los ensayos se realizaron por triplicado. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición considerando que el 0% corresponde a la mezcla de reacción sin inhibidor.

*SECCIÓN B: ESTUDIO DE HIDROLIZADOS OBTENIDOS POR LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS HIERONYMAINA Y POMIFERINA SOBRE LACTOSUERO COMERCIAL Y LACTOSUERO OBTENIDO POR COAGULACIÓN CON QUIMOSINA*

*1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES DE LACTOSUERO*

Se trabajó empleando como sustratos dos sueros diferentes: un concentrado de proteínas de suero bovino en polvo (WPC 80, Bioenergéticos Pablo Marzuolo, Argentina) y suero obtenido en el laboratorio por coagulación con Quimosina.

El primero se reconstituyó a 50 °C en agua destilada para obtener una preparación al 5% p/v. El pH se ajustó en 4,6 con HCl 1 N y se almacenó a -20 °C.

En el segundo caso, se preparó una solución de leche descremada al 12% (San Regim) en solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, se colocó en un baño termostático a 40 °C y se coaguló con Quimosina, utilizando 45 µl de stock de la enzima (50 IMCU/ml) por cada 100 ml de leche. Luego de 30 min, se dividió y distribuyó el coagulo en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 10 °C y 16000 g durante 30 min. El suero obtenido en cada tubo se mezcló en una probeta y luego se fraccionó en distintos tubos falcón para su almacenamiento a -20 °C.

*2. HIDROLISIS DEL SUERO*

*2.1.* Con el fin de determinar las condiciones óptimas de hidrólisis, la suspensión de suero comercial se hidrolizó utilizando los precipitados etanólicos redissueltos (PER) de las enzimas Hieronymaína y Pomiferina. El ensayo se realizó colocando 45 µl de PER en un tubo Eppendorf, en baño termostático a 45 °C y luego 500 µl de suero con diluciones 1/10 y 1/100, a pH = 9 (llevado con NaOH 1 N). La hidrolisis se cortó con 500 µl TCA 5% a los 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min. Como blanco se utilizó una mezcla de reacción que contenía 45 µl de H<sub>2</sub>O, 500 µl de suero (en su dilución correspondiente) y 500 µl de TCA 5% y otra con 45 µl de enzima, 500 µl de H<sub>2</sub>O y 500 µl de TCA 5%.

*2.2.* Se realizó la hidrolisis del suero comercial y del obtenido con Quimosina, utilizando las condiciones elegidas en el ensayo anterior, siguiendo un protocolo igual al del punto 2.1 (90 µl de PER, por cada ml de suero a pH 9) a excepción del modo de detener la hidrólisis. En este caso se detuvo llevando cada tubo a un baño de agua a

100 °C durante 5 min. Se realizaron dos blancos, uno llamado de tiempo cero, que consistió en mezclar el volumen de PER con el correspondiente volumen de suero e inmediatamente colocar el tubo en el baño de agua a 100 °C por 5 min y otro llamado blanco de enzima, en el que el PER se reemplazó por el mismo volumen de agua destilada. Una fracción de cada hidrolizado se filtró utilizando tubos Amicon de 3 KDa. Las dos fracciones (hidrolizados filtrados y sin filtrar) se almacenaron a -20 °C.

### *3. ELECTROFORESIS DE LOS HIDROLIZADOS*

Los sueros hidrolizados, obtenidos en 2.1 (sección B), se corrieron electroforéticamente en geles de Tricina, utilizando el mismo procedimiento y soluciones detalladas en el apartado 7.1 de la sección A.

### *4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDROLISIS*

Se empleó el método del TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfónico) basado en la reacción de este compuesto con los grupos amino primarios expuestos al hidrolizar los enlaces peptídicos (Adler-Nissen 1979). Este método es laborioso ya que requiere sucesivas incubaciones en diferentes baños termostáticos en ausencia total de luz.

En este ensayo se analizaron los hidrolizados de suero comercial obtenidos con los PER de Hieronimaína y Pomiferina a tiempos 0, 30, 90 y 180 min (cada uno se ensayó por triplicado). Las muestras se diluyeron para lograr una concentración de aproximadamente 1mg/ml. Para tal fin la dilución se realizó mezclando 40 µl de muestra con 250 µl de buffer A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2125 M con SDS 1% pH: 8,2). Para realizar la curva de calibración, un stock de Leucina 45 mM se diluyó 1:10 y a partir de esta solución se prepararon en distintos tubos Eppendorf, diluciones para la curva de calibración. En la Tabla 14 se describen los volúmenes y las concentraciones utilizadas.

Leu mM (curva)	Vol. de Leu 4,5 mM (μl)	Vol. de buffer A (μl)
0	0	160
0,225	8	152
0,45	16	144
0,9	32	128
1,125	40	120
1,5	53,6	106,4
2,25	80	80

**Tabla 14.** Volúmenes y concentraciones utilizados para la curva de concentración.

Se calentaron las muestras, incluso las diluciones patrón de Leucina, a 75 °C en baño María durante 15 min. Se colocaron tubos Kahn de plástico en una gradilla y en cada uno 40 μl de muestra o patrón y 320 μl de buffer A. Todos se taparon con papel de aluminio, luego se les agregó 320 μl de TNBS diluido 1:200 (con buffer A) apenas rompiendo el papel sobre cada tubo para impedir la entrada de luz. La gradilla sin el papel de aluminio se llevó a un baño termostático a 50 °C. Este se tapó con papel de aluminio y se incubó durante 1h. Luego de este tiempo se retiró la gradilla, se envolvió en papel de aluminio y se cargaron 640 μl de HCl 0,1N en cada tubo, apenas rompiendo el papel de aluminio para que no entre luz. Se cubrió la gradilla con otro trozo de papel de aluminio y se dejó 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se leyó la Absorbancia a 340 nm en el UV con cubeta de cuarzo (NH<sub>2 t</sub>). El cálculo del Grado de Hidrólisis (GH%) se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$GH\% = 100 \times (\text{NH}_{2 t} - \text{NH}_{2 t=0}) / (\text{NH}_{2 \infty} - \text{NH}_{2 t=0})$$

En donde:

$$\text{NH}_{2 \infty} = (1/\text{PM}_{\text{promedio de aa}}) \times (1 + f_{\text{Lys}}) \times C_{\text{Prot}}$$

$$\text{PM}_{\text{promedio de aa}}: 130\text{g/mol}$$

$$f_{\text{Lys}} \text{ (proporción de Lisina en las proteínas): } 1/16$$

C<sub>Prot</sub>: concentración de proteínas en la muestra, determinada por el método de Lowry empleando una curva de calibración de leucina.

## *5. ANALISIS DE LOS PÉPTIDOS PESENTES EN LOS HIDROLIZADOS*

### *5.1. Concentración de péptidos por Lowry*

Los hidrolizados del suero obtenido por coagulación de leche con Quimosina (SLQ) se analizaron por el método de Lowry para determinar su concentración peptídica. Las soluciones utilizadas fueron:

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en NaOH 0,1 N
- Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1%
- Solución de Tartrato de Sodio y Potasio 2%
- Solución de Folin diluido: Reactivo de Folin-Ciocalteu y agua destilada (relación 1:1)

Las muestras analizadas fueron los hidrolizados de tiempo 0, 30, 90 y 180 min, filtrados, con diluciones 1/10. Se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de péptidos en las muestras, utilizando un patrón de seroalbúmina bovina de 2 mg/ml. A partir de diluciones de esta solución se obtuvieron otras de concentración 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{l/ml}$ .

Para realizar este ensayo se mezclaron en el momento volúmenes iguales de la solución de sulfato de cobre y de tartrato de sodio y potasio. A esta solución se la llamó "B". Luego 1 ml de solución B se combinó con 50 ml de solución A para formar la solución AB. La mezcla de reacción se formó a partir de 200  $\mu\text{l}$  de muestra (hidrolizados o patrón) y 1 ml de la solución AB. A los tubos que contenían la mezcla anterior se los agitó en vórtex durante 10 min, luego se les agregó 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin diluido y por último se agitaron nuevamente durante 30 min. Se realizaron triplicados tanto de los hidrolizados como del patrón. Se midió la absorbancia a 750 nm.

### *5.2. Análisis por HPLC*

Se ensayó la purificación de los hidrolizados de las dos enzimas filtrados con membranas de corte de 3 kDa, de tiempos 0, 30, 90 y 180 min, mediante cromatografía en fase reversa (HPLC-RP) empleando una columna bondclone 10 C-18 Phenomenex de 3,5 ml, y un gradiente lineal de 35 volúmenes de columna entre 100% de agua-TFA (0,50 ml TFA% v/v) al comienzo y 100% de acetonitrilo-TFA (0,25 ml TFA 25% v/v) al final, en un equipo Äkta-Purifier. El volumen de muestra sembrado en cada caso fue de 200  $\mu\text{l}$  y la velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

### *5.3. Análisis por MALDI-TOF*

La espectrometría de masas ha sido considerada durante mucho tiempo como el método más seguro y sensible para obtener la información sobre el peso molecular de moléculas pequeñas. Se utilizó un equipo MALDI-TOF para determinar la masa molecular del suero hidrolizado por 90 min con el PER de cada enzima. Las muestras se mezclaron con la matriz (ácido sinapínico disuelto en ácido trifluoroacético al 1%). El espectro de masas se determinó con un espectrómetro Bruker modelo Ultraflex equipado con láser de nitrógeno (337 nm con pulsos de 1-5 ns) y una fuente de aceleración de iones de 25 kV, utilizando tripsinógeno bovino para su calibración interna. Las principales masas moleculares fueron analizadas con la herramienta informática FindPept ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), junto con las secuencias de las principales proteínas de lactosuero, para obtener las posibles secuencias de los péptidos presentes en los hidrolizados. Esta determinación se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica y Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona.

*SECCIÓN C: ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVA, ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE LOS HIDROLIZADOS*

*1. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA*

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en el punto 7.3 de la sección A. En este caso las muestras utilizadas fueron los hidrolizados de SLQ, obtenidos con los PER de las dos enzimas a los tiempos 0, 30, 90 y 180 min. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y tanto los controles utilizados como los cálculos efectuados se realizaron de acuerdo a lo descrito en el mencionado punto de la sección A. Adicionalmente, se determinaron las IC<sub>50</sub> de los hidrolizados con mayor poder inhibitorio de la ECA.

*2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE*

Se determinó el poder antioxidante de los hidrolizados de SLQ, con las dos enzimas a los tiempos 0, 30, 90 y 180 min. Este ensayo se llevó a cabo mediante la inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno y DPPH, siguiendo el protocolo explicado en el punto 7.2.1 de la sección A.

*3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS DE LACTOSUERO*

Los péptidos antimicrobianos son relativamente cortos (12 a 100 aminoácidos), cargados positivamente (carga neta 2 a 9) y anfipáticos o hidrofóbicos (Jenssen *et. al.*, 2006). La clase mejor estudiada de péptidos catiónicos antimicrobianos es aquella que muestra actividad antibacterial, propiedad atribuible a la posible interacción entre dichos péptidos y la membrana plasmática bacteriana (Chen *et. al.*, 2007). Con este trabajo se intentó demostrar la presencia de péptidos con actividad antibacteriana encriptados en proteínas de suero lácteo bovino susceptibles a ser liberados por proteólisis enzimática. Para ello primero se realizó un análisis de la estructura secundaria de las proteínas mayoritarias del suero, utilizando el programa HNN disponible en el servidor expasy (Combet, *et. al.*, 2000). Luego se realizó la búsqueda de secuencias aminoacídicas de péptidos antimicrobianos de diferentes orígenes utilizando el servidor NCBI y se los alineó

con el programa Clustalw (Larkin, *et. al.*, 2007) para determinar propiedades en común e intentar obtener una secuencia consenso. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la secuencia consenso y su posible estructura secundaria, utilizando los siguientes programas ProtParam (Gasteiger, *et. al.*, 2005), HNN (Combet, *et. al.*, 2000) disponibles en el servidor expasy, GOR4 (Garnier *et al.*, 1996) disponible en el servidor NPS@ (npsa-pbil.ibcp.fr/) y jPRED (Cole, *et. al.*, 2008) disponible en la página web <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>. Por último se utilizó la secuencia consenso y las secuencias de las proteínas de suero lácteo bovino para comprobar si hay regiones de similitud entre ellas mediante el programa Dotlet (Junier & Pagni, 2000) disponible en la página <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/dotlet>, con matrices pam 250.

#### *4. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA*

##### *4.1. Ensayos de difusión en placa*

Estos ensayos se realizaron con el fin de detectar la posible actividad antimicrobiana de los hidrolizados mediante la aparición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Las cepas utilizadas como indicadores fueron *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Bacillus cereus* ATCC 10876. Todos los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado a continuación:

##### **Preparación de agar nutritivo:**

Se preparó caldo nutritivo (Biokar Diagnostics) y se adicionó agar en proporción de 1,5 g cada 100 ml de medio. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y una atmósfera de sobrepresión durante 15 min.

##### **Plaqueo:**

En cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se colocó el agar nutritivo estéril y fundido en placas de Petri hasta una altura de 0,5 centímetros y luego se dejaron solidificar y secar semi tapadas durante 10-15 min.

##### **Repique en caldo nutritivo:**

Se esterilizó un ansa por incineración con mechero y se enfrió en las paredes de un tubo que contenía la cepa a emplear creciendo en agar sólido. Luego se utilizó para sembrar la

bacteria indicadora en un tubo de ensayo con aproximadamente 5 ml de caldo nutritivo previamente esterilizado en autoclave (121 °C y una atmósfera de sobrepresión durante 15 min). Se incubó en estufa de cultivo a 37 °C durante toda la noche.

**Siembra del microorganismo indicador:**

Se tomó la muestra del cultivo líquido anterior con una pipeta P-200 y se pasó a un tubo con solución salina estéril (aproximadamente 3 o 4 ml de solución de NaCl 8,5 g/l) hasta lograr la turbidez correspondiente al 0,5 de la escala de Mc Farland. Esto representa una concentración bacteriana de  $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml. Luego un hisopo estéril se mojó en esta solución, se escurrió en las paredes del tubo y se sembró en forma homogénea la placa de agar nutritivo.

Las muestras ensayadas fueron los hidrolizados de **suero comercial**, con las enzimas Hieronymaína y Pomiferina durante 0, 30, 90 y 180 min, filtrados con membrana de 3 kDa y llevados a pH 3,5 y 7 con HCl 1 M. También se realizó un blanco de enzima, es decir, suero filtrado más agua destilada en volumen igual al de enzima, que se trató igual que los hidrolizados. Asimismo se ensayaron las muestras concentradas 10 veces mediante liofilización y resuspensión en agua destilada a 1/10 del volumen original y pH ajustado utilizando NaOH y HCl 5 M en caso de ser necesario. Para la aplicación de la muestra, se realizaron pocillos con un sacabocados de 5 mm de diámetro donde se aplicó un volumen de muestra aproximado de 45 µl por pocillo. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se observó la presencia de halos de inhibición del crecimiento.

Se realizaron también ensayos de difusión con los hidrolizados de SLQ. Estos fueron concentrados 10 veces como se indicó en el punto anterior y ajustados a pH 7. La técnica empleada fue básicamente la descrita anteriormente a excepción que se colocaron 10 µl de muestra directamente sobre la superficie del medio de cultivo inoculado con el microorganismo indicador, tratando de no mover las placas hasta que la gota se absorbió.

*4.2. Ensayos de difusión*

En este punto se investigó la actividad antimicrobiana de diluciones de los hidrolizados de SLQ, para intentar determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para esta serie de ensayos se utilizaron microplacas estériles de fondo plano de 96 pocillos TCP-96T-SI, (Axygen, EE. UU.). Las soluciones, medios de cultivo y cepas son

las que se emplearon en el punto 4.1 de esta sección y todos los procedimientos se llevaron a cabo en cabina de flujo laminar.

Se realizó un ensayo de dilución preliminar utilizando la cepa de *Escherichia coli* como indicadora y los hidrolizados de suero de tiempo 30, 90 y 180 min a pH = 7, todos concentrados diez veces por liofilización. Como blanco se utilizó el hidrolizado de tiempo 0 min (10X). Todas las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en caldo nutritivo estéril bajo flujo laminar y antes de aplicarse se filtraron con filtro de celulosa de 0,22 micrones. En los pocillos de la primera y sexta columna de la microplaca se colocaron 250 µl de los hidrolizados de Pomiferina y Hieronymaína respectivamente, mientras que los pocillos de las columnas 2 a 10 se llenaron con 125 µl de caldo nutritivo estéril. Luego con una pipeta automática P200 se tomaron 125 µl del primer pocillo de la fila y se colocaron en el pocillo siguiente y este accionar se repitió desde la primer columna hasta la cuarta donde se descartaron los 125 µl sobrantes. Mediante este procedimiento se lograron sucesivas diluciones de las muestras desde Sin Dilución (D1/1, columna 1) hasta 1/16 (columna 5). Este accionar se repitió desde la columna 6 hasta la 10 para diluir los hidrolizados de suero con Hieronymaína. Por último se agregaron 2,5 µl de suspensión de *E. coli* al 0,5 de Mc Farland en cada pocillo. Los pocillos de la columna 11 se utilizaron para el control negativo que consistió en 125 µl de medio de cultivo y 125 µl de la muestra correspondiente a esa fila. En la columna 12 se realizó el control de cepa, para ello se colocaron en cada pocillo 125 µl de caldo nutritivo y 2,5 µl de *E. coli*. También se realizó un control de medio de cultivo en el último pocillo de las columnas 11 y 12, que simplemente consistió en 125 µl de medio estéril. En la Figura 4 se esquematiza la distribución de los hidrolizados y sus diluciones en cada placa. Por último se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas ELISA Rainbow Reader, SLT Lab Instruments, antes y después de incubar durante 24 h a 37 °C, para poder calcular el crecimiento del microorganismo restando la absorbancia medida a tiempo cero de la medida luego de las 24 h de incubación.

	Dilución	D 1/1	D 1/2	D 1/4	D 1/8	D 1/16	D 1/1	D 1/2	D 1/4	D 1/8	D 1/16	Ctrl (-)	Ctrl cepa
Tiempo (min)	Fila / Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	A											P 30	
30	B											H 30	
90	C											P 90	
90	D											H 90	
180	E											P 180	
180	F											H 180	
0	G											0	
-	H												

**Figura 4.** Esquema para el ensayo de dilución con muestras filtradas. El recuadro rojo corresponde a la placa y las celdas verdes representan a los pocillos con hidrolizados de Pomiferina y las celestes a los hidrolizados de Hieronimaína. En la columna “Tiempo” se indica el tiempo de hidrólisis de la muestra utilizada en la fila correspondiente, se trate de un hidrolizado de Hieronimaína o Pomiferina. En la columna “Ctrl (-)”, las letras indican la enzima utilizada para obtener la muestra y el número que las precede el tiempo de hidrólisis. D1/1 significa muestra sin diluir.

Se realizó otro ensayo de dilución en microplaca similar al anterior, pero utilizando dos cepas: *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Bacillus cereus* ATCC 10876. Las diluciones de las muestras se llevaron a cabo de la manera ya descrita y se utilizaron los mismos volúmenes, medios de cultivo, controles y soluciones. Las muestras fueron concentradas al igual que en el punto anterior por liofilización y resuspensión en un volumen de medio estéril igual a la décima parte del volumen original. Cada una de ellas se esterilizó antes de utilizarse por calentamiento en baño de agua a 85 °C por 10 min, debido a que la densidad elevada hizo imposible su filtración. La disposición de las muestras en las dos microplacas fue idéntica y lo único que varió entre ellas fue la cepa utilizada, en la Figura 5 se esquematiza una de ellas. Luego se midió la absorbancia a 600 nm antes y después de incubar por doce horas a 37 °C.

	Dilución	D 1/1	D 1/2	D 1/4	D 1/8	D 1/16	D 1/1	D 1/2	D 1/4	D 1/8	D 1/16	Ctrl (-)	
Tiempo (min)	Fila / Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	A											P 30	Ctrl cepa
30	B											H 30	Ctrl cepa
90	C											P 90	Ctrl cepa
90	D											H 90	Ctrl ½
180	E											P 180	Ctrl ½
180	F											H 180	Ctrl ½
0	G											0	
	H												

**Figura 5.** Placa para el ensayo de dilución. El recuadro rojo corresponde a la placa, las celdas verdes representan los pocillos con hidrolizados de Pomiferina y las celestes los hidrolizados de Hieronimaína. En

la columna de título “Tiempo” se indica el tiempo de hidrólisis de la muestra utilizada en la fila correspondiente, se trate de un hidrolizado de Hieronimaína o Pomiferina. En la columna de título “Ctrl (-)”, las letras indican que enzima que se utilizó para generar la muestra y el número que las precede el tiempo de hidrolisis. Las abreviaturas Ctrl cepa y Ctrl ½ significan control de crecimiento de la cepa y control de esterilidad del medio de cultivo respectivamente. D1/1 significa muestra sin diluir.

*RESULTADOS*  
*y*  
*DISCUSIÓN*

## SECCIÓN A

1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y LOS PRECIPITADOS ETANÓLICOS REDISUELTOS DE *HIERONYMAÍNA* Y *POMIFERINA*

## 1.1. Actividad específica de extractos proteolíticos

En el caso de *Maclura Pomífera*, se realizó una extracción primaria del látex denominada extracto crudo (EC) y se purificaron parcialmente las proteínas por precipitación con distintos volúmenes de etanol (PER), para determinar con cuál se recupera la mayor cantidad de proteína y la mayor actividad enzimática. Para esto se determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford y la actividad caseinolítica de los EC y de los PER, como se indicó en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Muestra	Concentración de proteínas (mg/ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
EC	1,19 ± 0,03	9,4 ± 0,9	7,9 ± 0,8
PER 1V	1,26 ± 0,06	7,8 ± 0,5	6,2 ± 0,5
PER 2V	1,18 ± 0,03	6,5 ± 0,5	5,5 ± 0,4
PER 3V	1,50 ± 0,05	6,44 ± 0,04	4,3 ± 0,1
PER 4V	1,63 ± 0,01	6,4 ± 0,3	3,9 ± 0,2
PER 5V	1,35 ± 0,06	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2
PER 6V	1,50 ± 0,08	4,4 ± 0,6	2,5 ± 0,8

**Tabla 15.** Concentración de proteínas, actividad caseinolítica y actividad específica del Extracto Crudo (EC) y los Precipitados Etanólicos Redisueltos (PER) de Pomiferina, con 1, 2, 3, 4, 5 y 6 volúmenes de Etanol.

A partir de la Tabla 15 se calculó el porcentaje de actividad específica de cada PER respecto al EC, y se determinó que se recupera un 78,20% de la actividad específica cuando se precipitan las proteínas con un volumen de etanol. Al emplear más volumen de alcohol se observa que la actividad específica decae y por lo tanto se eligió trabajar con el PER obtenido a partir de un volumen de etanol.

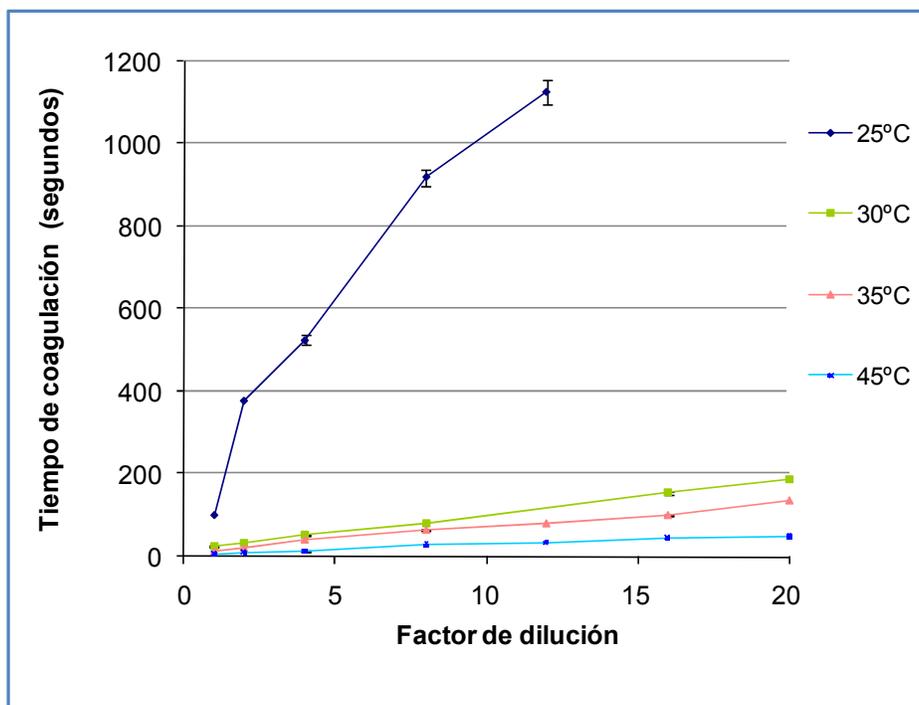
Para Hieronymaína se realizó un EC y con una fracción del mismo se realizó una purificación por precipitación con cuatro volúmenes de etanol (esta relación de volúmenes fue determinada en trabajos previos). Sus características se indican en la Tabla 16.

Muestra	Concentración de proteínas (mg/ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
EC	0,74 ± 0,01	6,8 ± 0,5	9,2 ± 0,6
PER	0,71 ± 0,01	4,5 ± 0,3	6,3 ± 0,4

**Tabla 16.** Concentración de proteínas, actividad caseinolítica y actividad específica del Extracto Crudo (EC) y Precipitado Etanólico Redisuelto (PER) de Hieronymaína.

### *1.2. Empleo de Pomiferina como coagulante de la leche*

Se evaluó la capacidad de distintas diluciones del EC de Pomiferina para coagular una suspensión de leche descremada al 12% en solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, a 25, 30, 35 y 45 °C. Estos resultados se representan en la Figura 6, donde puede verse la relación inversamente proporcional que existe entre la temperatura y el tiempo de coagulación.



**Figura 6.** Tiempo de coagulación de leche en polvo reconstituida en función de la dilución del Extracto Crudo de Pomiferina a distintas temperaturas. En cada punto las barras de error indican la desviación estándar.

Realizando el análisis de cuadrados mínimos a cada serie de datos de la Figura 6, se determinó que para una misma temperatura los tiempos de coagulación presentan una relación lineal con la dilución del EC (Tabla 17).

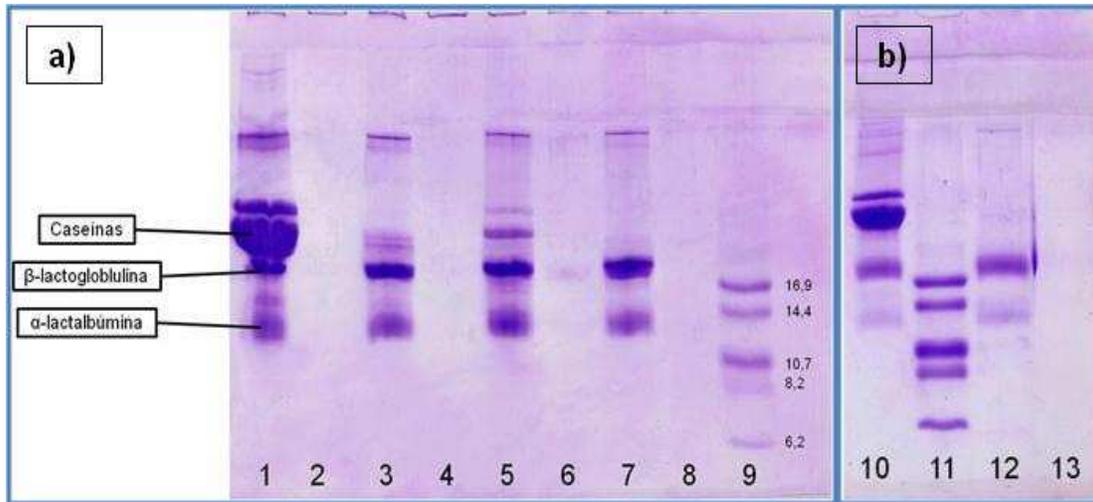
Serie	Valor de $R^2$
25 °C	0,98
30 °C	0,99
35 °C	0,98
45 °C	0,98

**Tabla 17.** Valor de  $R^2$  para cada serie de datos de la Figura 5.

A pesar de que la quimosina que actualmente se utiliza para coagular la leche es recombinante y por lo tanto su costo ha disminuido, existen ciertos sectores de la sociedad que prefieren el uso de alternativas naturales, razón por la cual la búsqueda de coagulantes de origen vegetal se ha intensificado en los últimos años (Chazarra *et al.*, 2003). Recientemente se ha reportado el uso de algunas fitopeptidasas serínicas con capacidad coagulante de la leche (Kumari *et al.*, 2010; Singh & Dubey, 2011). Por lo tanto, resultaría de utilidad el empleo de Pomiferina como coagulante de la leche, ya que *M. pomifera* es una especie cultivada en nuestro país sólo con fines ornamentales y contiene grandes cantidades de peptidasas serínicas que no son empleadas actualmente en ningún proceso industrial.

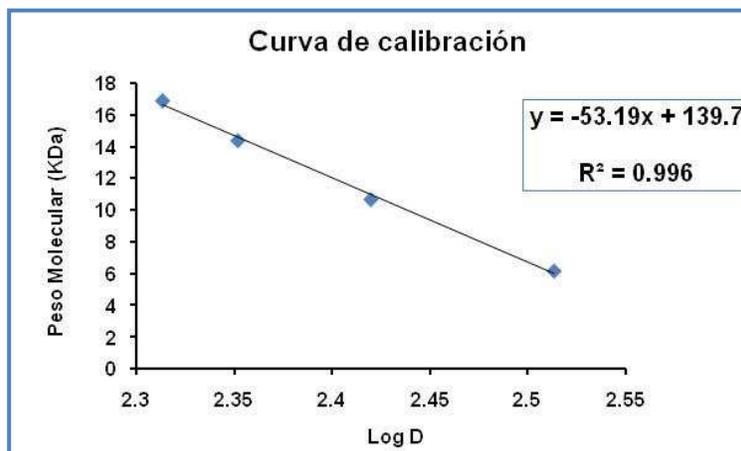
## *2. ELECTROFORESIS DE LOS SUEROS OBTENIDOS POR COAGULACIÓN DE LECHE CON POMIFERINA Y HÍERONYMAÍNA*

Los sueros obtenidos se dividieron en dos fracciones una de las cuales fue filtrada (fracción  $\leq 5$  kDa). Estas fracciones se analizaron para determinar su perfil proteico mediante una electroforesis desnaturalizante en geles de tricina con un gel de stacking, un gel separador y un gel de resolución. Los resultados se muestran en la Figura 7.



**Figura 7. a)** Electroforesis de los sueros obtenidos por coagulación de leche con Quimosina y Pomiferina. 1 Leche. 2 Leche filtrada. 3 y 4: Suero obtenido por coagulación con Quimosina sin filtrar y filtrado, respectivamente. 5 y 6: Suero obtenido por coagulación con Bromelina sin filtrar y filtrado, respectivamente. 7 y 8: Suero obtenido por coagulación con Pomiferina sin filtrar y filtrado, respectivamente. 9: Patrón de Peso Molecular Peptide Marker Kit GE (2,512 - 16,949). **b)** Electroforesis del suero obtenido por coagulación con Hieronymaína. 10: Leche. 11: Patrón de Peso Molecular Peptide Marker Kit GE (2,512 - 16,949). 12 y 13: Suero obtenido por coagulación con Hieronymaína, sin filtrar y filtrado, respectivamente.

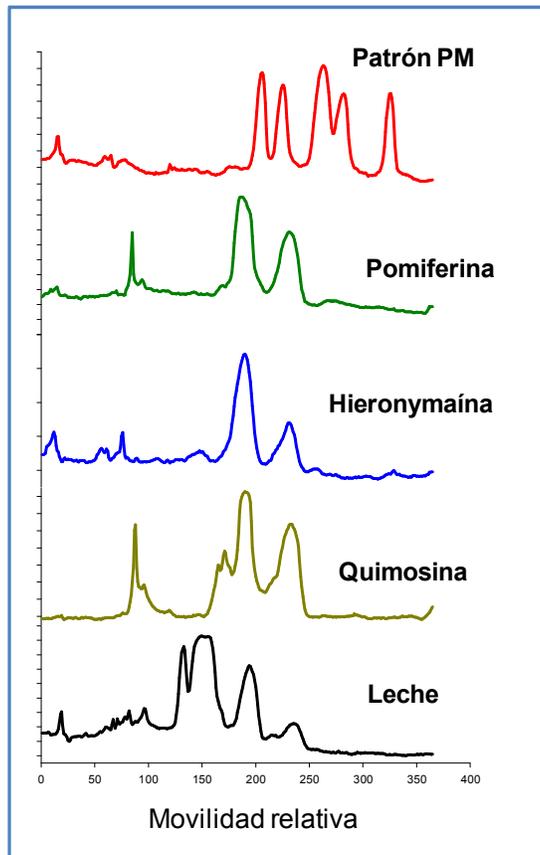
Para el cálculo de las masas moleculares aproximadas de cada banda se realizó una curva de calibración con los marcadores de peso molecular en función del logaritmo decimal de su distancia electroforética. Esta curva se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Curva de calibración. Patrones de Peso Molecular en función del Logaritmo decimal de la distancia relativa.

Puede apreciarse en la Figura 7 que los sueros obtenidos por coagulación de leche con Pomiferina y Hieronymaína contienen una gran proporción de  $\beta$ -lactoglobulina ( $19,3 \pm 0,4$  kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina ( $13,4 \pm 0,2$  kDa) y que no aparecen bandas de caseína como en el caso de la leche del suero obtenido con Quimosina o con Bromelina. Como es de esperar las calces correspondientes a los sueros filtrados no presentan bandas ya que quedarían fuera del límite de detección de esta metodología. Esta observación resultó de utilidad para comprobar la eficiencia del proceso de filtrado con la membrana de 5 kDa. En la leche entera se pueden observar además las bandas correspondientes a las caseínas (26,1 y 31,7 kDa). El suero obtenido por coagulación con Bromelina, que fue utilizado como control, presenta bandas intensas de 28,4 y 24,0 kDa, que corresponderían a caseínas enteras o parcialmente degradadas. Por último el suero obtenido con quimosina presenta dos bandas de 24,1 y 22,9 kDa, además de las correspondientes a proteínas de lactosuero.

Las bandas correspondientes a la leche y los sueros sin filtrar fueron analizadas por densitografía empleando el software Scion Image (URL: <http://www.scioncorp.com>) que convierte la intensidad de color de las bandas en datos numéricos. Los resultados se muestran en la Figura 9.



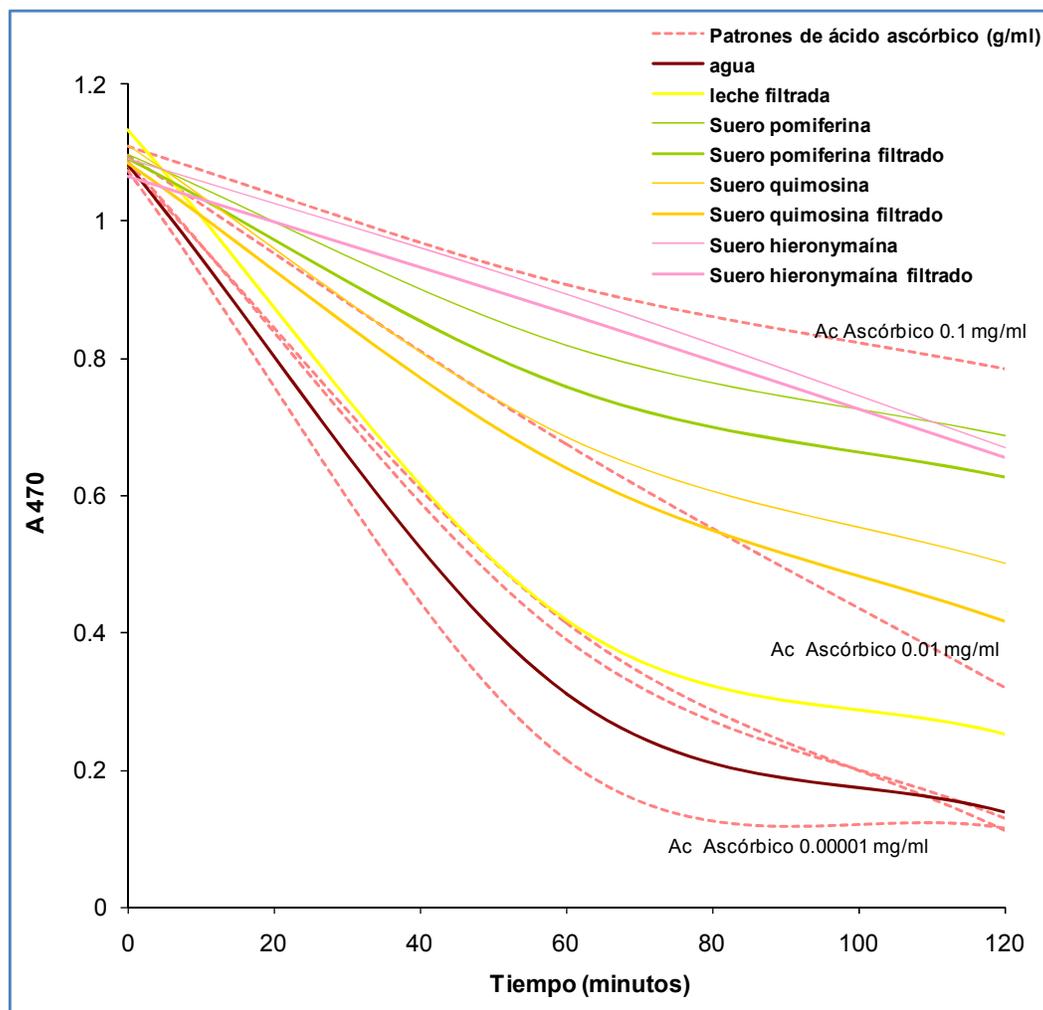
**Figura 9.** Grafico de los datos obtenidos del análisis por densitografía de las bandas del gel de los sueros obtenidos por coagulación de leche con Quimosina, Pomiferina y Hieronymaína. En el eje x se indica la movilidad relativa de las bandas. Quimosina. Hieronymaína y Pomiferina indican en este caso: los sueros obtenidos por coagulación con las enzimas correspondientes. Patrón de PM: marcadores de peso molecular.

Se puede concluir al ver la Figura 9, que los sueros obtenidos por coagulación de leche con Hieronymaína y con Pomiferina, presentan perfiles electroforéticos distintos al del suero obtenido por coagulación con Quimosina.

### *3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS SUEROS OBTENIDOS POR COAGULACIÓN CON POMIFERINA Y HIERONYMAÍNA*

La determinación de actividad antioxidante por reducción del radical DPPH no arrojó resultados concluyentes, mostrando valores similares en todos los casos y del orden del obtenido para la leche. Este hecho puede atribuirse a que la técnica incluye una precipitación previa de las muestras con etanol 96%, empleando luego los sobrenadantes en el ensayo ya que éste se realiza en medio etanólico y de esta manera se evita la formación de precipitado en el momento de realizar la lectura a 517 nm. Consecuentemente, se estarían eliminando todos los péptidos insolubles en etanol incluyendo aleatoriamente aquellos que presentasen alguna actividad biológica.

El ensayo de detección de actividad antioxidante visualizada como porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno permitió observar que en todos los casos, la inhibición siempre es mayor para los sueros sin filtrar respecto de los filtrados (Figura 10). Los mayores valores registrados fueron exhibidos por los sueros obtenidos con Pomiferina (suero sin filtrar:  $50 \pm 0,26\%$ ; suero filtrado:  $45 \pm 0,18\%$ ) y con Hieronymaína (suero sin filtrar:  $49 \pm 2,8\%$ ; suero filtrado:  $48 \pm 1,2\%$ ). Adicionalmente se determinó que dichos valores de actividad antioxidante se hallan comprendidos entre los correspondientes a soluciones patrón de ácido ascórbico de 0,01 y 0,1 g/ml, sustancia empleada industrialmente tanto por sus propiedades nutritivas como por su actividad antioxidante. Por otra parte el porcentaje de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno correspondiente a la leche filtrada fue de un  $20 \pm 0,5\%$ , por lo tanto, la actividad antioxidante detectada en los sueros provenientes de la coagulación de la leche con Pomiferina y Hieronymaína podría ser atribuida a pequeños péptidos producto de la proteólisis de las proteínas lácteas que no se encuentran inicialmente en la leche y que se liberan durante la etapa de coagulación.



**Figura 10.** Inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno. La grafica muestra la Absorbancia a 470 nm vs el tiempo de incubación para cada muestra. Se indica la concentración de tres patrones de ácido Ascórbico.

#### 4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA DE LOS SUEROS OBTENIDOS POR COAGULACIÓN CON POMIFERINA Y HIERONYMAÍNA.

En un screening inicial se detectó actividad inhibitoria de la ECA en el suero obtenido coagulando leche con Pomiferina. Por lo tanto se profundizó el estudio de este

lactosuero, sin realizar el mismo procedimiento con el obtenido empleando Hieronymaína.

#### 4.1. Determinación del contenido peptídico del lactosuero obtenido con Pomiferina

Se realizó la cuantificación peptídica por el método de Lowry al suero filtrado y sin filtrar, obtenido por coagulación de leche con Pomiferina. La Figura 11 muestra la curva de calibración.

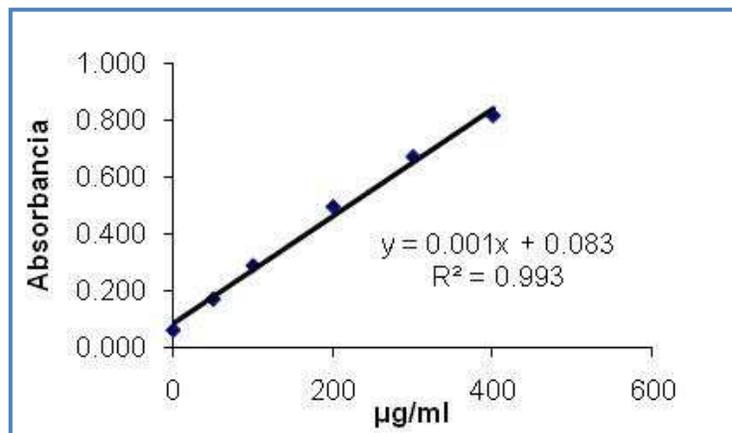


Figura 11. Curva de calibración. Absorbancia vs patrones de Seroalbúmina bovina.

A partir de esta curva se determinó que la concentración de péptidos en el suero lácteo que no fue filtrado es de  $11,1 \pm 0,7$  mg/ml y para el suero que fue filtrado de  $2,7 \pm 0,3$  mg/ml.

#### 4.2. Actividad inhibitoria de la ECA

El fundamento de este método se basa en la capacidad de la ECA de hidrolizar el sustrato y permitir que éste emita fluorescencia. Si la enzima es inhibida por la muestra a ensayar, la fluorescencia es menor que la emitida por el blanco de enzima y por lo tanto también lo será la pendiente de la curva fluorescencia vs. tiempo. Para realizar este ensayo se filtraron (5 kDa), liofilizaron y concentraron cinco veces los sueros obtenidos por coagulación de leche con Pomiferina y con Quimosina. A partir del suero obtenido con Pomiferina se realizaron diluciones sucesivas para obtener soluciones concentradas en factores de 5, 2,5, 1,25 y 0,5 veces. Las pendientes de las curvas de fluorescencia en función del tiempo de incubación fueron determinadas por triplicado para cada muestra. En la Tabla 18 se indican estos valores promediados con la desviación estándar correspondiente.

Muestra	Concentración peptídica (mg/ml)	Pendiente	% de actividad de la ECA	% de inhibición de la ECA
<b>Blanco Enzima</b>		0,35 ± 0,05	100,0	0,0
<b>Pomiferina 5X</b>	13,5	0,26 ± 0,03	74,2	25,8
<b>Pomiferina 2,5X</b>	6,75	0,30 ± 0,04	86,6	13,4
<b>Pomiferina 1,25X</b>	3,38	0,33 ± 0,03	94,4	5,6
<b>Pomiferina 0,5X</b>	1,35	0,37 ± 0,05	100,0	0,0
<b>Quimosina 5X</b>		0,31 ± 0,02	88,0	12,0

**Tabla 18.** Pendiente de la curva de fluorescencia en función del tiempo. Blanco Enzima: ECA más sustrato, sin muestra. Pomiferina y Quimosina: suero obtenido por coagulación de leche con Pomiferina y Quimosina más sustrato, respectivamente.

Se determinó en este ensayo que el suero de 13,5 mg/ml obtenido con Pomiferina, inhibe en un 25,8% la actividad de la ECA, y este valor es más del doble

del que se obtiene para el suero obtenido por coagulación de leche con Quimosina, enzima que se utiliza comúnmente en la elaboración de Quesos.

Se realizó el mismo ensayo para una solución de Pomiferina filtrada con membrana de 5 kDa y el porcentaje de inhibición de la ECA resultó igual a 0,0%; de esta manera se comprobó que la inhibición estudiada en los sueros no proviene de péptidos generados por autoproteólisis de la Pomiferina. Teniendo en cuenta este resultado podemos concluir que la utilización de Pomiferina como coagulante de la leche permitiría obtener un suero con valor agregado por su actividad inhibitoria de la ECA y además que esta actividad podría ser causada por péptidos menores a 5 kDa, provenientes de la proteólisis de las proteínas lácteas que se liberan durante la etapa de coagulación.

Por último se estimó la  $IC_{50}$  (concentración de péptido que inhibe un 50% a la ECA), realizando la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración del suero ( $Y = 2,092X - 1,862$ ;  $R^2 = 0,99$ ). La  $IC_{50}$  para el suero obtenido con Pomiferina fue de 24,8 mg/ml mientras que para el captopril (un inhibidor competitivo comercial) es de 0,034  $\mu$ g/ml. Este valor tan alto para el suero en contraste con el del captopril, concuerda con un bajo porcentaje de inhibición de la ECA, lo cual puede deberse a que los péptidos con actividad inhibitoria estarían en baja proporción, inmersos en un medio que contiene una gran variedad de otros péptidos generados por la proteólisis de las proteínas lácteas, mientras que el captopril es un inhibidor comercial puro.

Por lo tanto, debido a la habilidad que poseen Hieronymaína y Pomiferina, no sólo para coagular la leche sino también para producir un suero con actividad antioxidante e inhibitoria de la ECA (sólo en el caso de Pomiferina), podrían ser consideradas como herramientas capaces de liberar péptidos bioactivos y transformar el lactosuero en un producto con mayor valor agregado, con la potencial posibilidad de ser empleado en la manufactura de alimentos funcionales. Adicionalmente, a partir de estas observaciones se plantea la hipótesis de que los péptidos bioactivos generados puedan proceder tanto de las caseínas como de las proteínas del lactosuero, expuestas a las fitopeptidasas durante la coagulación de la leche. Por lo tanto, en la

siguiente sección se analizará la posibilidad de que esos péptidos provengan de proteínas del lactosuero, obteniendo y analizando hidrolizados de esta fracción proteica.

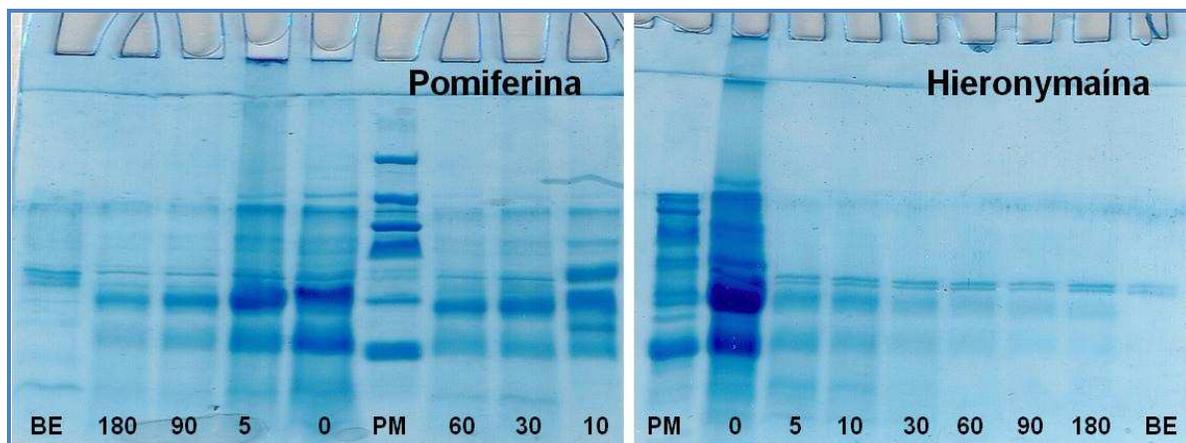
## *SECCIÓN B*

De acuerdo a los datos obtenidos en la sección A se concluye que las fitopeptidasas estudiadas hidrolizan proteínas lácteas liberando péptidos, que pueden provenir de la degradación de caseínas o de las proteínas del lactosuero, y que poseen diferentes actividades. Por lo tanto el trabajo realizado en esta sección tiene el fin de determinar si tales actividades provienen de las proteínas del suero, caracterizando y estudiando detalladamente los hidrolizados obtenidos tanto con Pomiferina como con Hieronymaína.

### *1. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS Y SEGUIMIENTO POR ELECTROFORESIS*

Se ensayaron distintas condiciones de hidrólisis. En un principio la temperatura utilizada fue de 37 °C y como se obtuvo una hidrólisis deficiente los ensayos posteriores se realizaron a 45°C. Por otro lado, el lactosuero comercial (WPC 80, Bioenergéticos Pablo Marzuolo, Argentina) empleado en una concentración 5% p/v, resultó ser muy concentrado y formaba agregados, por lo que se utilizó luego una dilución 1/10 de esta suspensión.

Se realizó la electroforesis del **suero lácteo comercial** hidrolizado durante distintos tiempos con Pomiferina y Hieronymaína, a 45 °C y diluciones 1/10 y 1/100, para observar la degradación de las proteínas a medida que transcurre el tiempo de hidrólisis. En la Figura 12 se observan los geles para el suero con dilución 1/10 hidrolizado con Pomiferina y Hieronymaína, en el caso del suero 1/100 la dilución fue muy grande no pudieron observarse las bandas con nitidez.



**Figura 12.** Electroforesis del suero lácteo hidrolizado con Pomiferina y Hieronymaína. PM indica marcadores de Peso Molecular. 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 indican los minutos de hidrólisis a los que se sometió el suero de cada calle. BE indica blanco de enzima, compuesto por agua más enzima y TCA.

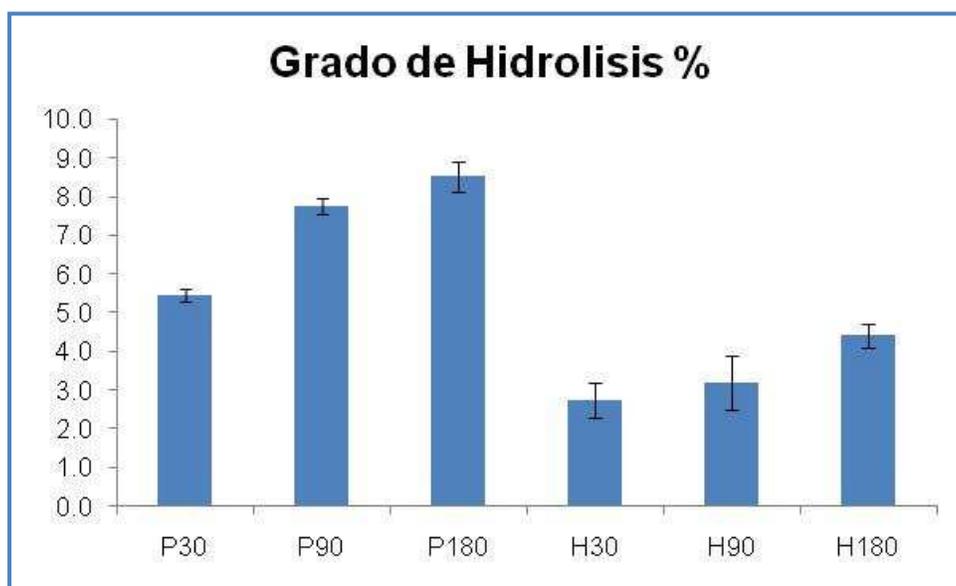
Se puede ver en la Figura 12 que a medida que transcurre el tiempo de hidrólisis las bandas correspondientes a las proteínas del suero sin hidrolizar (calle 0 en la Figura 12) tienen cada vez menor intensidad. Los péptidos generados por la hidrólisis de las proteínas componentes del suero, escapan a la resolución del método y no pueden observarse en la figura de manera definida. Se eligieron los siguientes tiempos para realizar los hidrolizados con los que se trabajará en los ensayos de la sección B) y C): 0 (suero sin hidrolizar), 30, 90 y 180 min.

Por otra parte, en algunas electroforesis previas realizadas al suero comercial se pudo apreciar gran cantidad de caseínas como contaminante; por lo tanto posteriormente se empleó **suero obtenido coagulando leche con quimosina (SLQ)**, que resultó poseer menos caseínas.

## 2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Mediante el método del TNBS se determinó el grado de hidrólisis del SLQ hidrolizado con Pomiferina y Hieronymaína durante 30, 90 y 180 min. En la Figura 13

se representa el grado de hidrólisis promedio de cada muestra, en donde las barras de error indican la desviación estándar entre ellas.

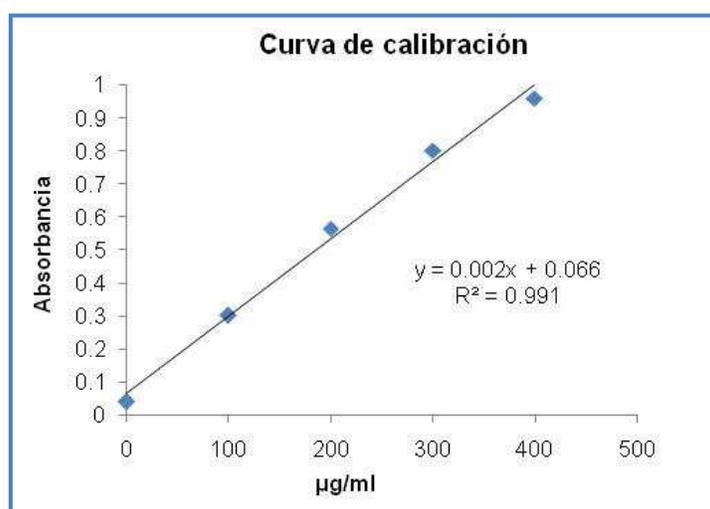


**Figura 13.** Método del TNBS. Grado de hidrólisis para los hidrolizados de suero lácteo con Pomiferina (P) y Hieronymaína (H), cuantificado mediante una curva de calibración con soluciones patrón de leucina (0-2,25 mM). Las barras de error indican la desviación estándar. L significa control de suero lácteo sin hidrolizar. 30, 90 y 180 representan los tiempos de hidrólisis.

El grado de hidrólisis obtenido luego de 180 min fue  $8,5 \pm 0,5\%$  para el hidrolizado de suero con Pomiferina y en el caso del hidrolizado con Hieronymaína este valor fue de  $4,4 \pm 0,2\%$ . Se pudo determinar que a medida que el tiempo de hidrólisis aumenta, también lo hace el grado de hidrólisis y que Pomiferina parece tener un efecto hidrolítico más importante que Hieronymaína sobre el suero lácteo.

### 3. CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDOS DE LOS HIDROLIZADOS

Se determinó la concentración peptídica de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaína del SLQ. Estos hidrolizados fueron filtrados con membrana de 3 KDa y se les realizó una dilución 1/10 para que la lectura de absorbancia no sea mayor a 1. En la Figura 14 se muestra la curva de calibración hecha con los patrones de concentración de seroalbúmina.



**Figura 14.** Absorbancia de las soluciones patrón de seroalbúmina. En el gráfico se muestra la ecuación de la recta y su  $R^2$ .

A partir de la curva de calibración se determinaron las concentraciones de los hidrolizados del suero que se indican en Tabla 19. Se realizó la medición del suero filtrado sin hidrolizar, para utilizarlo como control.

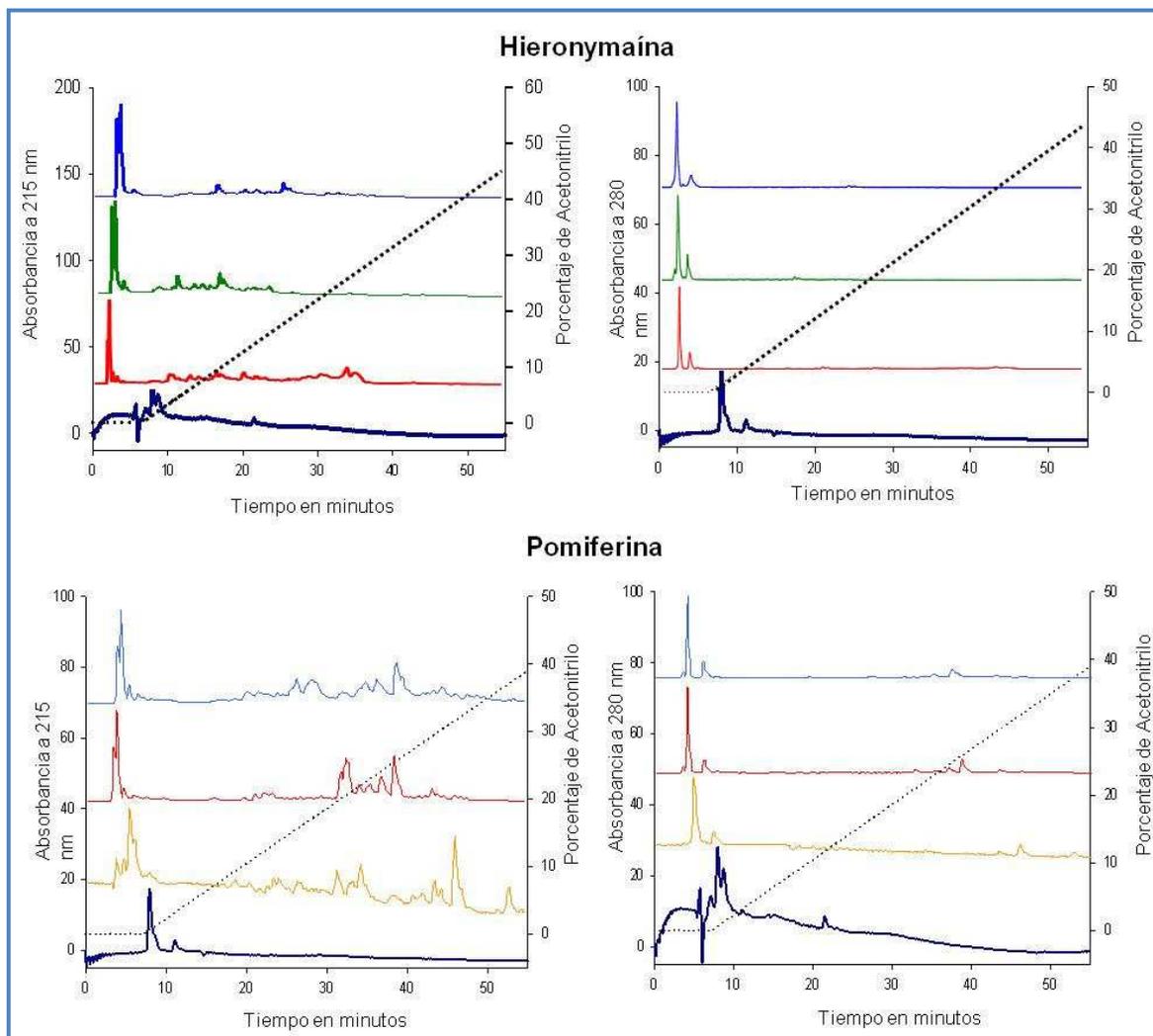
Muestra	C (mg/ml)
Suero (tiempo cero)	0,57 ± 0,05
P30	2,7 ± 0,1
P90	3,76 ± 0,04
P180	4,3 ± 0,1
H30	1,84 ± 0,02
H90	2,85 ± 0,03
H180	4,34 ± 0,06

**Tabla 19.** Concentración peptídica de los hidrolizados filtrados. P y H indican Hidrolizados del suero con Pomiferina y Hieronymaína respectivamente. 30, 90 y 180 indican los minutos de hidrólisis de esa muestra.

Se pudo determinar que la concentración peptídica en los hidrolizados del suero con Pomiferina y Hieronymaína que fueron filtrados, se eleva a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, y que es significativamente mayor que la concentración del suero que no se hidrolizó. Esta observación estaría relacionada con el aumento del número de péptidos de masa molecular menor a 3 kDa a medida que avanza la reacción de hidrólisis.

#### 4. ANÁLISIS POR HPLC DE LOS HIDROLIZADOS DEL SUERO LÁCTEO

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaína del SLQ, filtrados con membranas de corte de 3 kDa, además de un control de SLQ también filtrado pero no hidrolizado. Se midió la absorbancia a 215 y 280 nm, ya que a estas longitudes de onda absorben los enlaces peptídicos y los aminoácidos aromáticos respectivamente. En la Figura 15 se muestran las gráficas de los datos obtenidos.



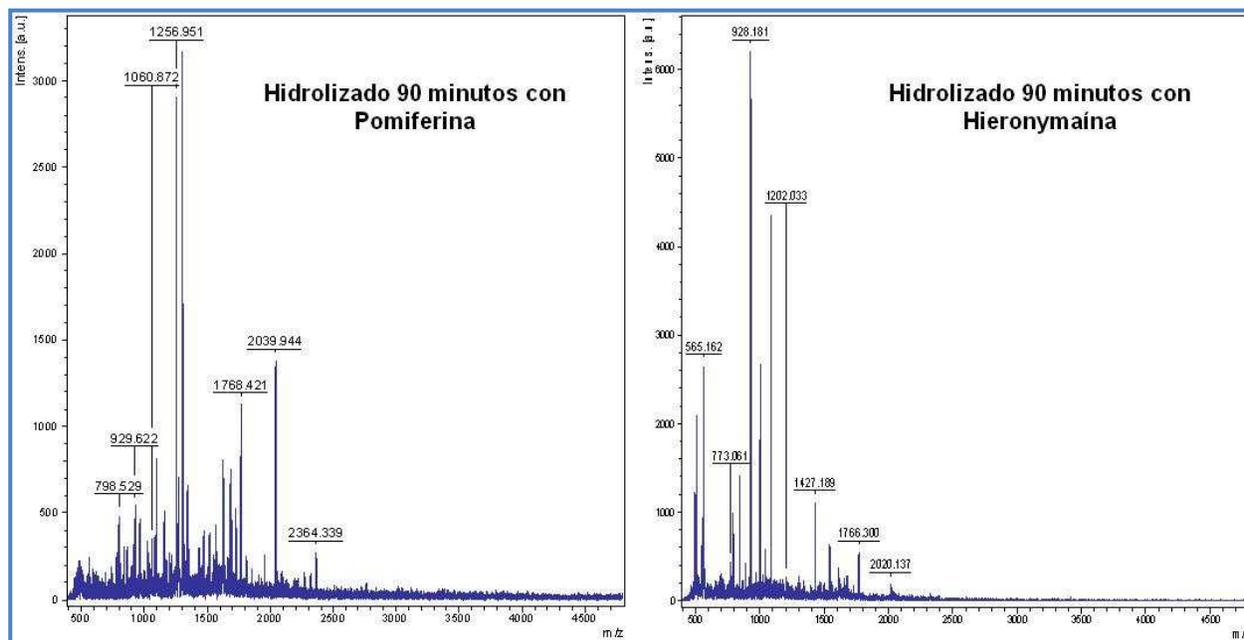
**Figura 15.** Perfiles de HPLC de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaína del suero lácteo a 215 y 280 nm. En las graficas de los hidrolizados obtenidos con Hieronymaína el color azul oscuro corresponde a las muestras de suero sin hidrolizar, mientras que las curvas rojas, verdes y azules corresponden a los hidrolizados de tiempo 30, 90 y 180 minutos respectivamente. Para los hidrolizados obtenidos con Pomiferina, la curvas azul oscura, naranja, roja y verde corresponden al suero sin hidrolizar, y a los hidrolizados de tiempo 30, 90 y 180 minutos, respectivamente. La línea de puntos indica el porcentaje de acetonitrilo.

Los hidrolizados de SLQ, obtenidos con Pomiferina y con Hieronymaína, presentaron perfiles distintos para cada tiempo de hidrólisis, evidenciando que la degradación de las proteínas del lactosuero formó péptidos de distintos tamaños. En

general se observa que los péptidos fueron poco retenidos por la columna por lo cual se puede suponer que no son de naturaleza hidrofóbica y por lo tanto no interaccionan con el relleno, que posee cadenas hidrofóbicas de 18 átomos de carbono. Por otra parte, el hecho de observar sobre todo en las muestras de sueros obtenidos con Hieronymaína la presencia de una fracción no retenida de gran tamaño, puede estar relacionada con que las muestras fueron aplicadas a la columna sin un tratamiento previo, que hubiese aumentado su afinidad por el relleno de la columna. Para el caso de los hidrolizados con Pomiferina, las curvas de absorbancia vs tiempo de elución mostraron un número mayor de picos que para el caso de Hieronymaína, tanto a 215 nm como a 280 nm. No se observa un patrón de picos persistentes con el tiempo que puedan sugerir que las peptidasas ya no puedan degradar los productos formados.

#### *5. ANÁLISIS POR MALDI-TOF*

Habiendo evidenciado la presencia de péptidos de diferente tamaño en las muestras, se analizaron por espectrometría de masa los hidrolizados de lactosuero comercial obtenidos con Pomiferina y Hieronymaína luego de 90 min por ser el tiempo de hidrólisis intermedio entre los que utilizamos para trabajar y porque nos permitiría tener un panorama de la composición peptídica de los hidrolizados.



**Figura 16.** Grafico de la intensidad de la señal (eje y) en función de la relación masa/carga, para los hidrolizados de lactosuero de 90 minutos obtenidos con Hieronymaina y Pomiferina. En la punta de cada pico se indica su masa en Da.

Las masas moleculares principales (las que se indican en los picos de la Figura 16) se analizaron utilizando la herramienta informática FindPept ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), para compararlas con las masas de péptidos encriptados en las principales proteínas de lactosuero, y así obtener un listado de posibles secuencias. Estas dependen de la procedencia del péptido, por lo tanto para utilizar este programa, se cargaron simultáneamente las masas de los péptidos obtenidas por MALDI TOF y la secuencia de las posibles proteínas de las cuales estos procederían. En este caso se analizaron las masas de cada pico principal de la Figura 16, con respecto a tres proteínas principales del lactosuero: Lactoferrina,  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina. El resultado es entregado como una tabla con las posibles secuencias peptídicas con una tolerancia en la diferencia de masas de 0,5 Da. Los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo I; en la Tabla 20 se muestra una selección reducida de los péptidos del Anexo I donde se restringió la tolerancia en la diferencia de masas a 0,05 Da.

Muestra	Péptido	Posición	Proteína en la que se encontró la secuencia
Pomiferina	EKKDAVTLDGGMVFEACR	43-61	Lactoferrina
	LQDGAGDVAFVKETTTFEN	191-209	Lactoferrina
	QDGAGDVAFVKETTTFENL	192-210	Lactoferrina
	HAVVARSVDGKEDLIWKLLSK	245-265	Lactoferrina
	LVGILFH	9-15	$\alpha$ -lactalbúmina
	AIVQNNDSTEYGLFQINN	59-76	$\alpha$ -lactalbúmina
Hieronymaína	GYLAVAVVKKANEGLTWNS	424-442	Lactoferrina
	AFALECIRAI AEKKDAVT	32-50	Lactoferrina
	NDSTE	64-68	$\alpha$ -lactalbúmina
	DECAQ	80-84	$\beta$ -lactoglobulina

**Tabla 20.** Péptidos resultantes del análisis de las masas del Maldi Tof con el programa FindPept, que poseen una diferencia de masas menor a 0.05 Da.

Se buscaron las secuencias de la Tabla 20 en la bibliografía y en la bases de datos NCBI y BIOPEP, sin encontrar mención en trabajos previos, a excepción de la secuencia NDSTE (Kumura *et. al.*, 2011). Este péptido fue encontrado en un hidrolizado de proteínas del suero lácteo, analizado por HPLC y se indica como proveniente de la  $\alpha$ -lactalbúmina, sin embargo en ese trabajo no se investigó su actividad biológica.

## *SECCIÓN C*

Habiendo determinado en la sección B las características y composición de los hidrolizados del lactosuero, se estudiaron sus propiedades antioxidantes y capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, al igual que en la sección A con el suero lácteo obtenido por coagulación de leche con Pomiferina y Hieronymaína. Asimismo se analizó la capacidad de los hidrolizados para inhibir el crecimiento microbiano.

El ensayo de actividad antioxidante se realizó con las muestras de SLQ hidrolizado con Pomiferina y Hieronymaína durante 30, 90 y 180 min. La determinación se llevó a cabo midiendo la capacidad de las muestras de inhibir la decoloración del  $\beta$ -caroteno. No se obtuvieron resultados concluyentes, ya que todas las muestras arrojaron valores de absorbancia del mismo orden que el control de tiempo 0 min, mientras que los controles positivos realizados con el antioxidante ácido ascórbico mostraron valores de capacidad antioxidante dependientes de su concentración.

### *1. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA*

Este ensayo se realizó con los hidrolizados del SLQ obtenidos con Pomiferina y Hieronymaína, concentrados cinco veces. Los ensayos para las muestras de 30, 90 y 180 min, obtenidas con las dos enzimas, se realizaron por separado y por eso en la Tabla 21 figuran dos blancos de enzima, que como se indico en Materiales y Métodos estaban compuestos por la ECA, el sustrato fluorogénico y agua destilada. A partir de estos se calcularon los porcentajes de actividad y de inhibición de la ECA. Se utilizó como control el SLQ, filtrado con membrana de 3 KDa y concentrado cinco veces, al igual que los hidrolizados.

Para comprobar que la inhibición de la ECA proviene de péptidos derivados de proteínas del lactosuero y no de péptidos producto de la autoproteólisis de Hieronymaína y Pomiferina, se realizó el ensayo para soluciones de estas enzimas. En

este caso se las empleó en la misma concentración utilizada en los hidrolizados y filtradas con la misma membrana, y no se detectó actividad inhibitoria de la ECA.

Muestra	Pendiente	% de actividad de la ECA	% de inhibición de la ECA
<b>SLQ</b>	0,305 ± 0,009	63,2	36,8
<b>BE P</b>	0,49 ± 0,04	100,0	0,0
<b>Pomiferina 30</b>	0,05 ± 0,01	10,3	89,7
<b>Pomiferina 90</b>	0,062 ± 0,005	12,6	87,4
<b>Pomiferina 180</b>	0,038 ± 0,003	7,7	92,3
<b>BE H</b>	0,40 ± 0,02	100,0	0,0
<b>Hieronymaína 30</b>	0,114 ± 0,008	28,7	71,30
<b>Hieronymaína 90</b>	0,06 ± 0,01	15,4	84,62
<b>Hieronymaína 180</b>	0,055 ± 0,009	13,8	86,20

**Tabla 21.** Porcentaje de inhibición de la ECA para cada uno de los hidrolizados del SLQ con Pomiferina y Hieronymaína. El porcentaje de actividad de la ECA se calculó tomando al blanco de enzima como 100% de actividad. BEH y BEP son los blancos realizados en los ensayos de los hidrolizados con Hieronymaína y Pomiferina respectivamente. SLQ es el suero lácteo obtenido por coagulación de leche con Quimosina, que fue filtrado y concentrado cinco veces igual que los hidrolizados. Todas las muestras se encuentran concentradas en un factor de 5.

Como se indica en la Tabla 21, los hidrolizados de SLQ con Pomiferina y Hieronymaína, a tiempo 30, 90 y 180 min, generan una inhibición mayor que el SLQ sobre la actividad de la ECA. Los hidrolizados obtenidos con Pomiferina generan una inhibición ligeramente mayor que los de Hieronymaína. En ambos casos, las muestras de 180 min demostraron ser las que mayor actividad inhibitoria producen y por lo tanto se eligieron estos hidrolizados para determinar las  $IC_{50}$ . Para ello se hicieron diluciones de las muestras y se realizó para cada una el ensayo fluorométrico. Se calcularon sus pendientes, a partir de las cuales se obtuvieron los respectivos porcentajes de inhibición y se graficaron éstos en función de la concentración de las diluciones de los hidrolizados. En ambos casos se observó un aumento del porcentaje de inhibición de la ECA a medida que aumenta la concentración del hidrolizado, por lo que se estimó el

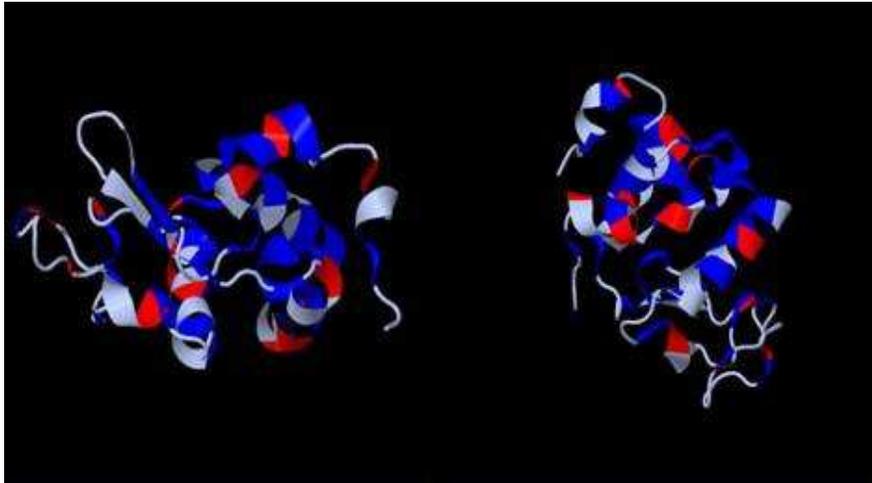
valor de  $IC_{50}$  por el método gráfico y mediante aproximaciones lineales empleando el software SigmaPlot V10.0. Para Pomiferina se graficó el logaritmo decimal del porcentaje de inhibición vs la concentración y se calculó la recta de regresión. En el caso de Hieronymaína, se graficó el porcentaje de inhibición vs la concentración y la regresión también fue una recta. Las ecuaciones, los valores de R cuadrado y el valor de  $IC_{50}$  para los hidrolizados del SLQ con Pomiferina y Hieronymaína a 180 min se resumen en la Tabla 22.

Hidrolizado	$IC_{50}$ (mg/ml)	Ecuación	$R^2$
<b>P180</b>	2,99	$Y = 0.245X + 0.967$	0,999
<b>H180</b>	1,69	$Y = 28.89X + 0.97$	0,97

**Tabla 22.** Valores de  $IC_{50}$  para los hidrolizados del SLQ con Pomiferina (P180) y Hieronymaína (H180) de 180 minutos.

El valor obtenido con Pomiferina (2,99 mg/ml) resultó ser un orden de magnitud menor que el obtenido para el lactosuero exudado cuando se coaguló la leche con esta enzima (24,8 mg/ml). Estos datos sugieren que se mejora la producción de péptidos con actividad inhibitoria de la ECA al aumentar el tiempo de contacto de esta preparación enzimática con las proteínas del lactosuero, logrando probablemente liberar más cantidad de péptidos inhibitorios. En el caso del uso de Hieronymaína, sólo se observó actividad inhibitoria en los hidrolizados del SLQ y no en el suero obtenido por coagulación de leche con dicha enzima. Como el porcentaje de actividad que se obtiene hidrolizando con Hieronymaína (86% a los 180 min) es mayor que el que se obtiene para el SLQ sin hidrolizar (36%) se puede concluir que la hidrólisis del SLQ con Hieronymaína libera péptidos con actividad inhibitoria de la ECA, que de otra manera se encontrarían encriptados en las proteínas, impedidos de ejercer esta función.

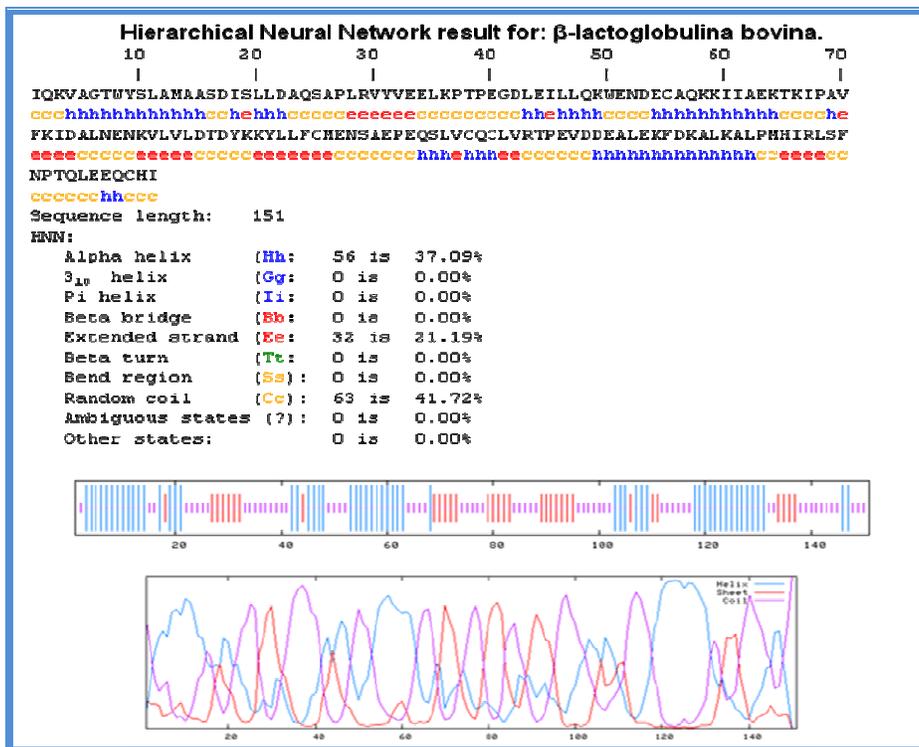




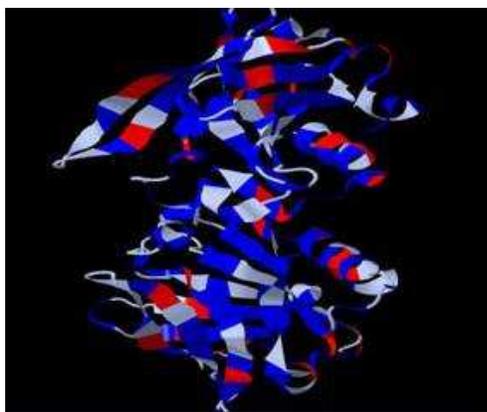
**Figura 18.** Estructura cristalizada de la  $\alpha$ -lactalbúmina, obtenida en la base de datos PDB (Protein Data Bank), (PDB ID: 1HFZ) y se visualizaron, utilizando el programa Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009), los aminoácidos apolares en azul y los cargados positivamente en rojo.

Se pudo observar que la  $\alpha$ -lactalbúmina posee un gran porcentaje de su secuencia bajo la estructura de alfa hélice (Figura 17) y que dentro de estas estructuras predominan los aminoácidos apolares y de carga neta positiva (Figura 18). Esto se condice con la estructura de péptidos antimicrobianos ya estudiados (González *et. al.*, 2005; Chen *et. al.*, 2007).

A continuación se muestran los resultados del mismo análisis para la  $\beta$ -lactoglobulina.

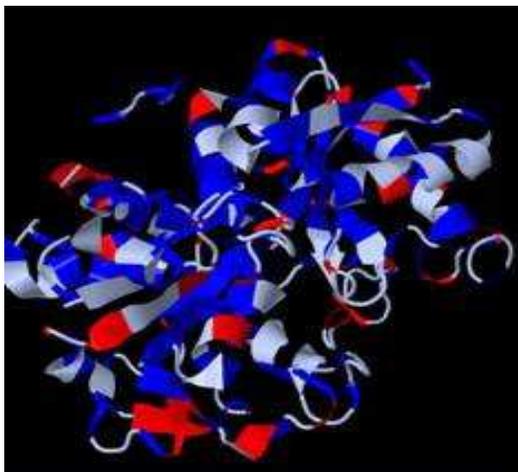


**Figura 19.** Resultados de HNN para la  $\beta$ -lactoglobulina. Debajo de cada aminoácido en la secuencia se indica con una letra en color la estructura que adopta, en la lista inferior se indica la referencia y el porcentaje de cada una.



**Figura 20.** Imagen de la estructura cristalizada de  $\beta$ -lactoglobulina, extraída de la base de datos PDB (Protein Data Bank), (PDB ID: 2Q2M), Se visualizó utilizando el programa jalview (Waterhouse et al., 2009), los residuos apolares se ven en azul y los cargados positivamente en rojo.





**Figura 22.** Imagen de la estructura cristalizada de la Lactoferrina disponible en la base de datos PDB (Protein Data Bank), (PDB ID: 3KJ7). Se visualizó utilizando el programa Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009). La imagen muestra la disposición 3D de los residuos apolares en azul y los cargados positivamente en rojo.

Si bien el porcentaje de aminoácidos que se encuentran bajo la estructura de  $\alpha$ -hélice no es mayoritario, este alcanza el 30% (Figura 21) y se pudo ver que esta conformación se presenta en varios segmentos de la secuencia. En la Figura 22 se observa que muchos de los aminoácidos polares y/o con carga positiva adoptan esta estructura.

- **Análisis de péptidos antimicrobianos conocidos.**

Se buscaron secuencias de péptidos antimicrobianos de diversos orígenes ya estudiados, en la base de datos NCBI. A continuación se detallan en formato FASTA.

```
>gi|913452|gb|AAB34064.1| antimicrobial peptide {immobilized peptide E17HSA magainin 2 deletion}
[synthetic, Peptide Synthetic, 17 aa]
SNMIEGVFAKGFKKASH
```

```
>gi|913451|gb|AAB34063.1| antimicrobial peptide {immobilized peptide E23GIG magainin2} [synthetic,
Peptide Synthetic, 23 aa]
SNMIEGVFAKGFKKASHLFGKIG
```



GWLKKGKGIKIERVQGHTRDATIQGLGVAQQAANVAATAR

**>Melittin**

GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

**>Humanlactoferricin**

GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFWQRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA

**>Bovinelactoferricin**

FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRAFA

**>LL-37**

LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

Se realizó un alineamiento de las secuencias de péptidos antimicrobianos de diversos orígenes con el programa Clustalw (Larkin, *et. al.*, 2007) el cual se analizó con el programa Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009) para obtener la siguiente secuencia consenso: **LKGL+KLLK++LKKLGKL+RGII+RRKKA**. Se reemplazaron los signos "+" por el aminoácido que apareció en mayor proporción en esa posición y se obtuvo la secuencia: **LKGLKLLKLGKLLKGLKRGIIIRKKA**. Se determinaron sus propiedades fisicoquímicas con el servidor ProtParam (Gasteiger, *et. al.*, 2005), estas se resumen en la tabla 23.

Propiedad	Valor
Número de aminoácidos	29
Peso Molecular (Da)	3312,3
Punto isoelectrico teórico	12,33
Residuos con carga negativa (Asp + Glu)	0
Residuos con carga positiva (Arg + Lys)	13
Promedio de Hidropaticidad	-0,290
Índice alifático	151,38

**Tabla 23.** Propiedades fisicoquímicas de la secuencia consenso.



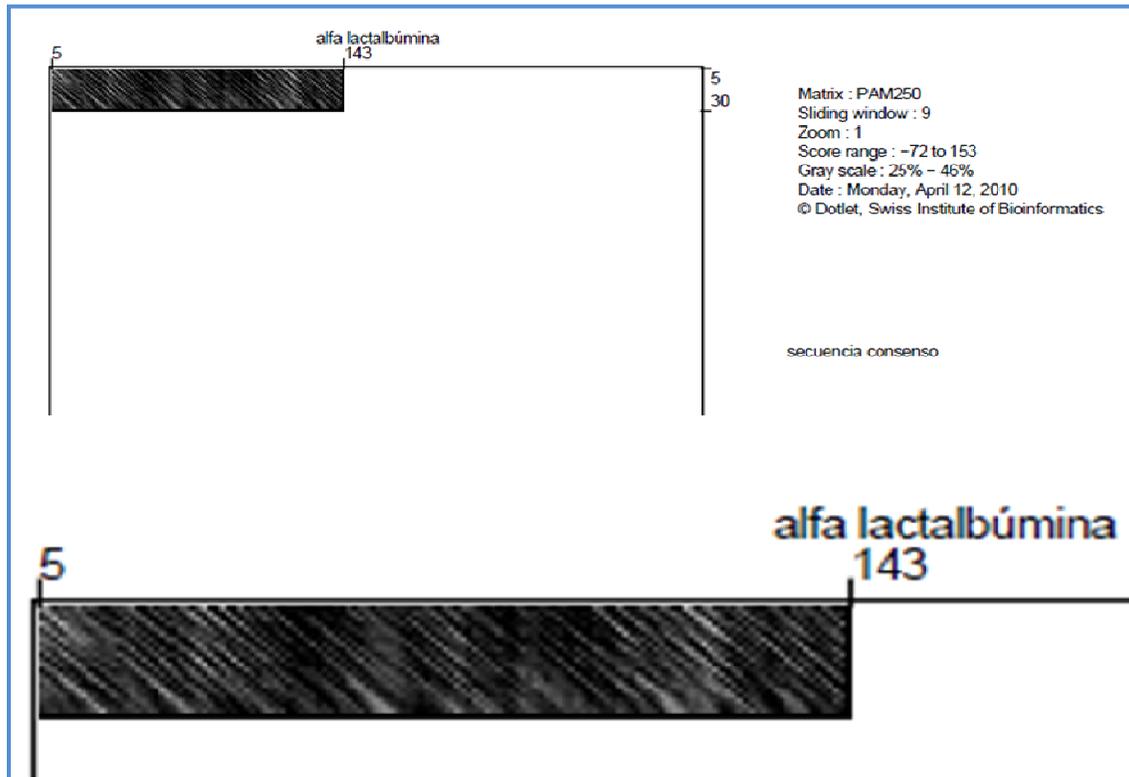
Se pudo observar que la secuencia consenso posee una mayoría de aminoácidos apolares y con carga positiva, dispuestos en forma de hélice y según lo visto en el primer ítem, es muy probable que en las proteínas del suero contengan sitios con propiedades fisicoquímicas y estructurales comparables. A continuación se utilizó el programa Dotlet, con matrices pam 250 para comprobar si efectivamente estas regiones de similitud existen.

- **Alineamiento de la secuencia consenso y las proteínas del suero**

Dotlet es un programa que se utiliza para buscar regiones de identidad o similitud entre dos secuencias. Una vez que se estas se cargan, el algoritmo las compara aminoácido por aminoácido y entrega el resultado en un gráfico de puntos en el que cada eje representa una de las secuencias. En el interior del gráfico, cada punto representa la similitud entre los aminoácidos correspondientes, un pixel negro significa una similitud baja y uno blanco indica que esta es alta.

#### ***Alineamiento $\alpha$ -lactalbúmina vs secuencia consenso***

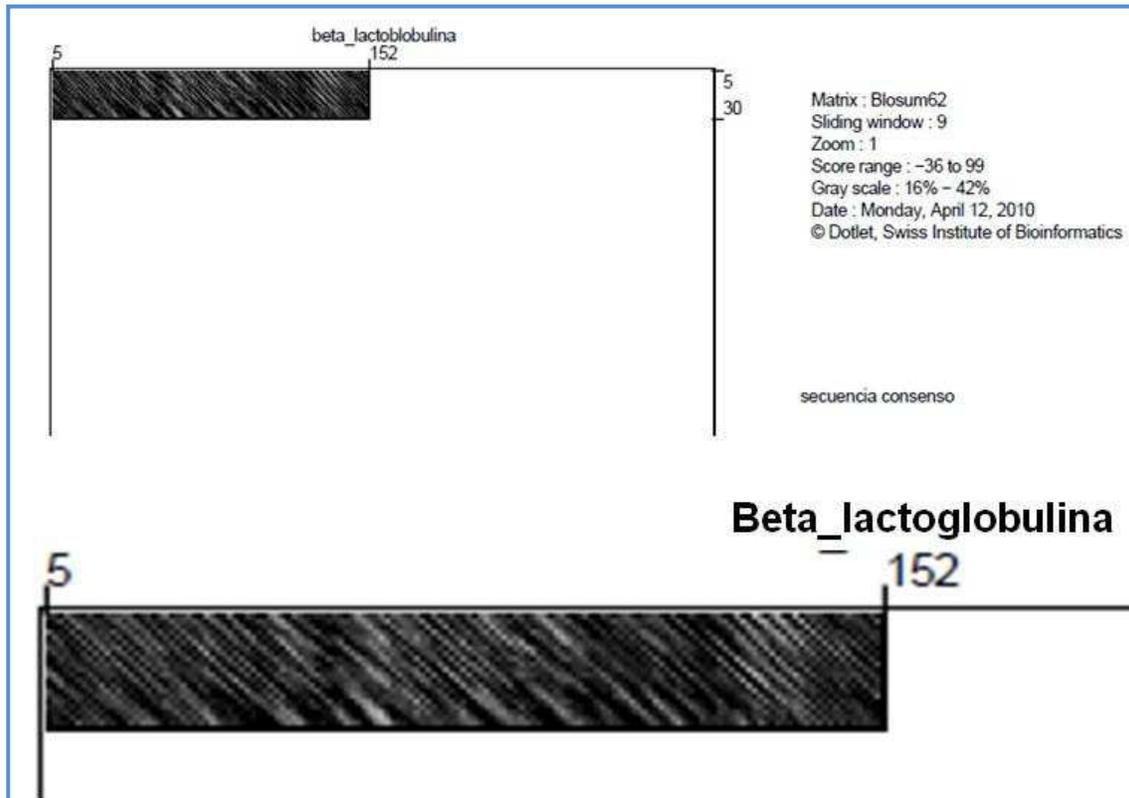
Para realizar el alineamiento se colocó en el eje horizontal de la interfase del programa a la secuencia de la  $\alpha$ -lactalbúmina y en el eje vertical a la secuencia consenso. Como resultado se constató que ciertas regiones de esta proteína del lactosuero son similares a la secuencia consenso aunque no en toda su extensión. En la Figura 25 estas zonas quedan representadas por las diagonales blancas sobre el fondo negro de la gráfica. A simple vista la extensión de las secuencias marcadas por estas diagonales parecen tener desde un tercio hasta la mitad del tamaño de la secuencia consenso, entre 10 y 14 aminoácidos aproximadamente, siendo estos tamaños comparables al de otros péptidos con actividad antimicrobiana encontrados en la bibliografía.



**Figura 25.** Resultado del alineamiento de la  $\alpha$ -lactalbúmina con la secuencia consenso utilizando el programa Dotlet con matrices pam 250. En la parte superior se muestra el resultado completo y en la parte inferior se amplía la imagen de interés.

### ***Alineamiento $\beta$ -lactoglobulina vs secuencia consenso***

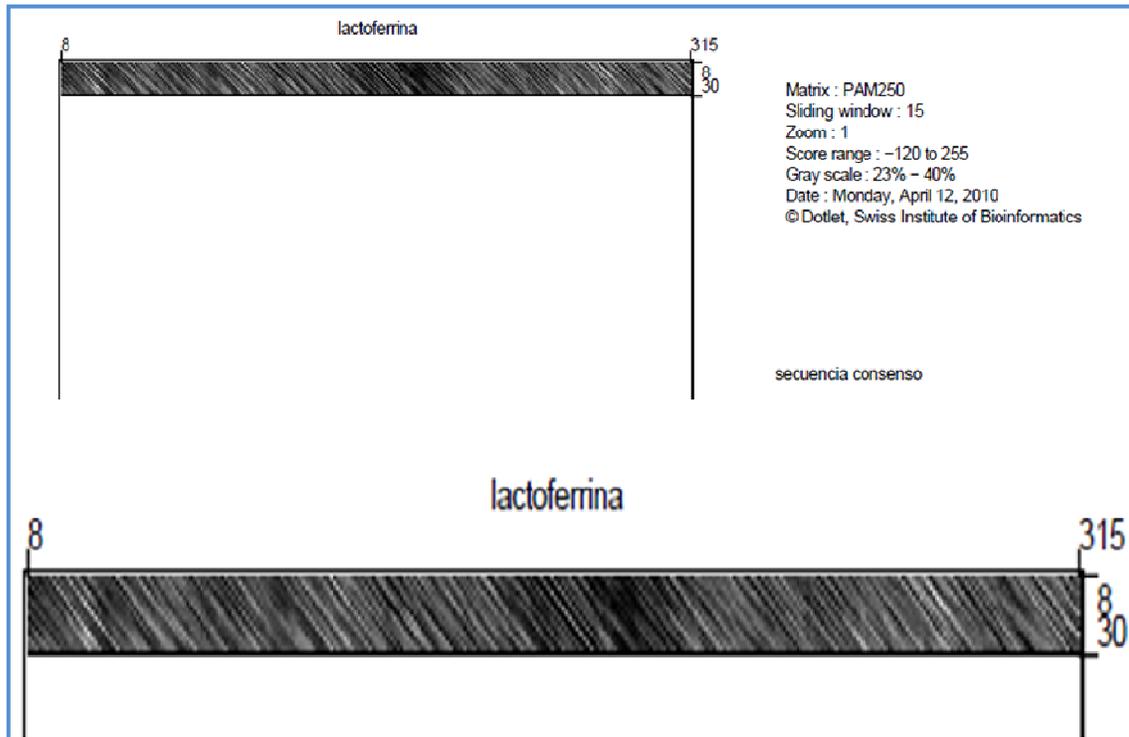
En este caso el resultado es el mismo que el obtenido para la  $\alpha$ -lactalbúmina, es decir, se constató que algunas regiones de la  $\beta$ -lactoglobulina son similares a la secuencia consenso aunque no en toda su extensión. En la Figura 26 estas regiones quedan representadas por las diagonales blancas sobre el fondo negro de la gráfica.



**Figura 26.** Resultado del alineamiento de la  $\beta$ -lactoglobulina con la secuencia consenso utilizando el programa Dotlet con matrices pam 250.

### ***Alineamiento Lactoferrina vs secuencia consenso***

Para la Lactoferrina el resultado fue un tanto distinto que para las otras proteínas, dado que se encontró que posee regiones similares a la secuencia consenso pero estas son más extensas y están presentes en mayor proporción, como puede verse en la figura 27.



**Figura 27.** Resultado del alineamiento de la Lactoferrina con la secuencia consenso utilizando el programa Dotlet con matrices pam 250.

Se concluyó que las tres proteínas del suero analizadas contienen regiones de diferente tamaño que son similares en su composición aminoacídica a la secuencia consenso. En el caso de la lactoferrina, estas regiones son similares en casi toda su extensión a la secuencia consenso y aparecen en mayor proporción que para la  $\alpha$ -lactalbúmina y para  $\beta$ -lactoglobulina. Es muy probable que mediante hidrólisis de las proteínas del lactosuero analizadas, se produzcan péptidos con características fisicoquímicas y estructurales similares a las que posee la secuencia consenso y por lo tanto es factible pensar que estos péptidos tengan actividad antimicrobiana.

### 3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Mediante el método de difusión en placa se analizó la actividad antimicrobiana de hidrolizados obtenidos por acción de las enzimas Pomiferina y Hieronymaína sobre suero comercial y suero obtenido coagulando leche con Quimosina (SLQ).

En el caso del **suero comercial** se ensayaron las muestras hidrolizadas durante 0, 30, 90 y 180 min, que fueron llevadas a tres pH diferentes (3, 5 y 7). Se emplearon *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* como microorganismos indicadores.



Figura 28. Placas recién sembradas.

No pudo establecerse una correlación entre los tiempos de hidrólisis y la actividad inhibitoria de las muestras ensayadas. Cuando la bacteria indicadora fue *B. cereus* su desarrollo no se vio afectado, pero en las placas sembradas con *E. coli* se obtuvieron halos de inhibición. Se destaca además que las muestras llevadas a pH 7 fueron las que mejores resultados dieron para los hidrolizados con ambas enzimas (Tabla 24).

Enzima con la que se obtuvo el hidrolizado	pH del hidrolizado	Muestras con indicios de inhibición
Pomiferina	3	BE y 0'
Pomiferina	5	180'
Pomiferina	7	BE, 30' y 180'
Hieronimaína	3	ND
Hieronimaína	5	ND
Hieronimaína	7	0', 30' y 180'

**Tabla 24.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *E. coli* por el método de difusión en agar de los sueros hidrolizados durante distintos tiempos mediante la acción de las enzimas Pomiferina y Hieronimaína, llevados a distintos pH. BE significa blanco enzima. 0', 30', y 180' significan 0, 30 y 180 minutos, respectivamente. ND significa no detectado

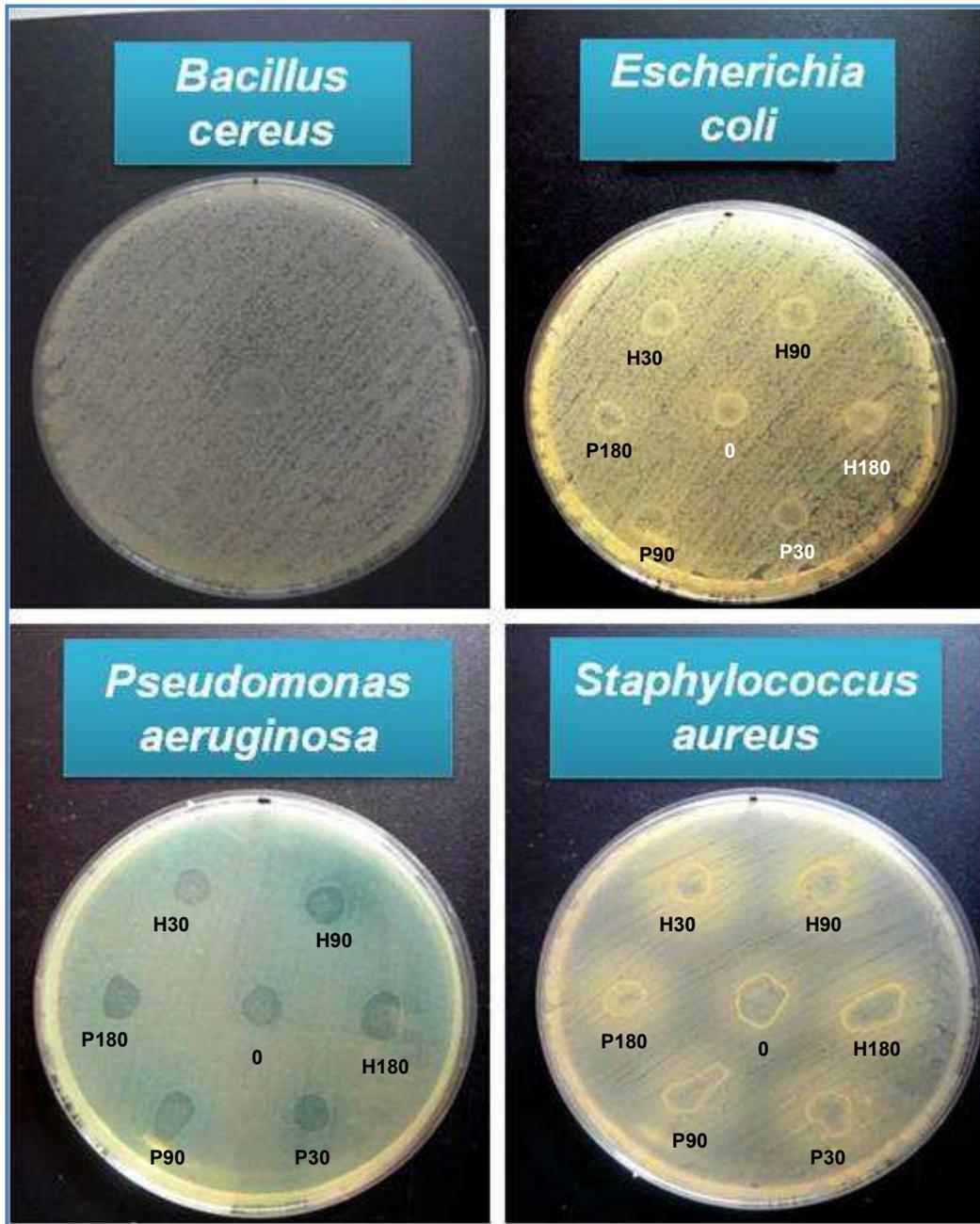
La presencia de halos de inhibición entorno a los pocillos correspondientes al blanco enzima y al tiempo cero, podría indicar que el tratamiento térmico de las muestras aportó cierta hidrólisis de las proteínas del suero, o también la posibilidad de que el suero comercial tenga en su composición elementos antibacterianos que a pesar del tratamiento se mantuvieron en las muestras.



**Figura 29.** Placa Pomiferina pH = 7.

Seguidamente se realizó el mismo ensayo con las muestras concentradas diez veces por liofilización y resuspensión en agua destilada, no observándose actividad inhibitoria bajo ninguna condición. Dicho comportamiento podría atribuirse a alteraciones de las muestras debidas a las sucesivas congelaciones, descongelaciones, liofilización y posterior resuspensión.

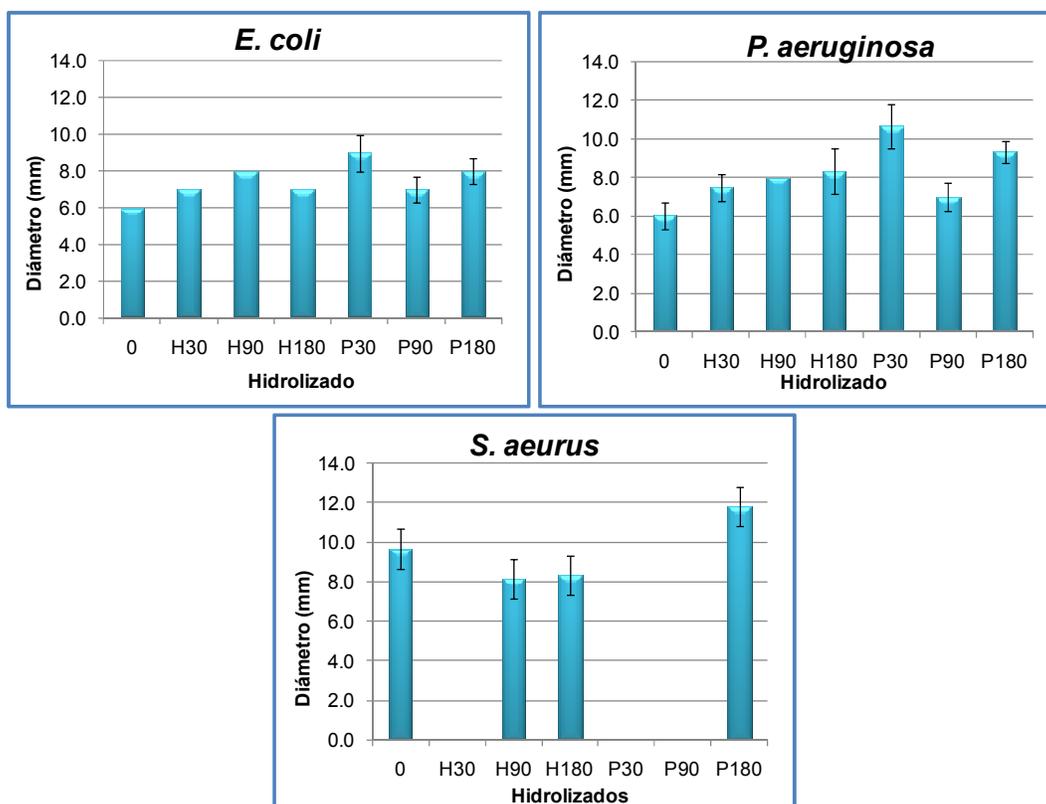
Los hidrolizados de **SLQ** fueron liofilizados y resuspendidos en una decima parte de su volumen en caldo nutritivo estéril y luego se almacenaron a - 20 °C hasta el momento de su utilización. Cuando fueron descongelados se observó la formación de un precipitado blanco, por lo cual las muestras se calentaron en baño de agua a 80 °C hasta desaparición de la turbidez (5 min aproximadamente). Se ensayaron los hidrolizados de tiempo 30, 90 y 180 min de las dos enzimas y uno con Pomiferina, de tiempo 0 min, empleando *E. coli*, *B.cereus*, *Ps. aeruginosa* y *St. aureus* como indicadores. Los resultados se muestran en la Figura 30.



**Figura 30.** Ensayo de difusión en agar sobre distintas bacterias indicadoras.

Se midieron los diámetros de halos en las placas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En los casos en que estos fueron muy irregulares se midieron en dos o tres

direcciones y se calculó un diámetro promedio y su desviación estándar. Se realizaron los gráficos de barra correspondientes (Figura 31).



**Figura 31.** Diámetro de los halos de inhibición de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en el ensayo de difusión en palca. Se indican las desviaciones estándar.

En el caso de *E. coli* se observaron halos regulares con un borde de mayor crecimiento y en su interior una disposición de colonias menor. Los hidrolizados H90, P30 y P180 presentaron un diámetro de halo superior al de tiempo 0, como se puede observar en la Figura 31. En la placa de *S. aureus*, los halos fueron demasiado irregulares y sólo se determinaron los diámetros de los hidrolizados de tiempo 0, H90, H180 y P180. Este último fue el único superior al tiempo 0. En cuanto a la placa de *P. aeruginosa*, los halos de inhibición fueron notorios y con crecimiento nulo o mínimo en el centro. En el caso del hidrolizado de tiempo cero, se observó desarrollo de colonias en su interior. Las muestras H90, H180, P30 y P180 mostraron un diámetro de

inhibición superior al de tiempo 0. Las muestras ensayadas contra *B. cereus* no mostraron halos de inhibición.

#### 4. Ensayos de dilución

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de difusión se realizó un ensayo de dilución con la cepa de *E. coli* como indicadora y los hidrolizados del SLQ llevados a pH = 7 y concentrados diez veces. Luego de medir la absorbancia antes y después de incubar, se realizó el siguiente cálculo:  $Abs\ 24\ h - Abs\ 0\ h = Abs\ 1$ . Donde Abs 24 h es la absorbancia medida luego de las 24 h de incubación y Abs 0 es la absorbancia de la placa antes de ser incubada. Luego el valor Abs1 se promedió con su duplicado para obtener la absorbancia promedio de cada hidrolizado para cada dilución.

Se realizó el ensayo trabajando en esterilidad y con los hidrolizados filtrados. Las muestras se calentaron 2 o 3 min a 80 °C para disolver el precipitado blanco que se observó al descongelarlas, el cual dificultaba el proceso de filtración. Los datos de absorbancia se trataron como se mencionó anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 25 y en la Figura 32. Se utilizó como hidrolizado de tiempo 0 min sólo al suero tratado con Pomiferina.

Absorbancia promedio *E. coli*.

Muestra	D1/1	D1/2	D1/4	D1/8	D1/16	Ctrl (-)	Ctrl cepa	Ctrl medio
O	ND	0,425	0,567	0,629	0,624	0	0,495	0
P30	0,087	0,413	0,486	0,556	0,560	0		
P90	0	0,187	0,255	0,280	0,280	0		
P180	0,360	0,439	0,523	0,530	0,539	0		
H30	0,103	0,140	0,248	0	0,238	0		
H90	0,212	0,356	0,432	0,408	0,382	0		
H180	0,124	0,436	0,584	0,539	0,568	0		

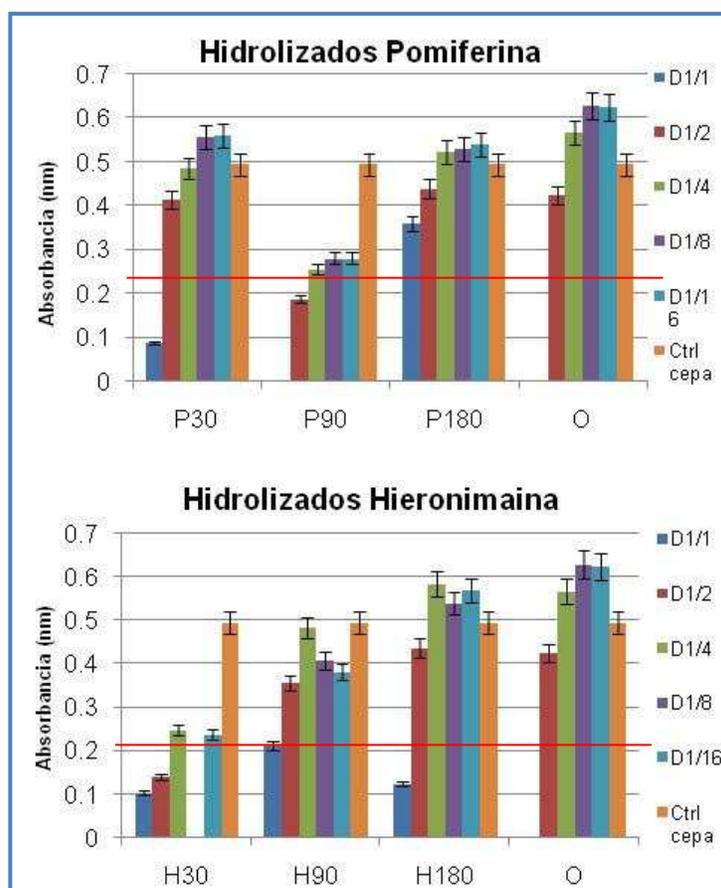
**Tabla 25.** Valores de absorbancia promedio de los duplicados. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, hidrolizado en medio de cultivo estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento de *E. coli* en medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizados con Hieronymaína a tiempos 30, 90 y 180 minutos. 0: Hidrolizados con Pomiferina a tiempo 0 minutos.

En la tabla se indican en rojo los valores de absorbancia que resultaron ser menores al 50% del valor del control de crecimiento microbiano. Se descartó el valor de tiempo cero sin diluir debido a la formación de un precipitado que impidió medir su absorbancia. Los controles negativos, de crecimiento y de medio arrojaron valores normales.

Se extrajeron varias conclusiones de este ensayo, por un lado todos los hidrolizados sin dilución (D1/1), excepto P180, inhibieron el crecimiento por debajo del 50% del control. Con el hidrolizado de Hieronymaína de 30 minutos se registraron valores de absorbancia menores al 50% del control de crecimiento a todas las diluciones ensayadas. Las muestras H30, P30 y P90 sin dilución, generaron porcentajes de inhibición del crecimiento de 79.2%, 82.4% y 100%, respectivamente. Ya que el crecimiento de *E. coli* no se vio afectado por el hidrolizado de Pomiferina de tiempo cero, se podría suponer que la actividad inhibitoria, que mostraron tener los

hidrolizados, se debería a la acción de péptidos liberados durante la hidrólisis de las proteínas del SLQ.

En los gráficos de barra de la Figura 32, se puede observar que al diluir los hidrolizados de SLQ de ambas enzimas, disminuye el efecto inhibitorio y que no existe una correlación directa entre el tiempo de hidrólisis y el grado de inhibición alcanzado. Esto último podría deberse a la diferente composición peptídica de los hidrolizados obtenidos a distintos tiempos, que se observó en el análisis por HPLC.



**Figura 32.** Absorbancia en función de la dilución de los hidrolizados. La línea roja marca un valor de absorbancia de 0.247 nm, que corresponde al 50% del valor registrado por el control de crecimiento. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, muestra más medio estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento, cepa más medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizados con Hieronimaína a tiempos 30, 90 y 180 minutos. O: Hidrolizados cortados a tiempo 0 minutos. La barra correspondiente D1/1 de O no figura debido a que este valor de absorbancia no pudo registrarse.

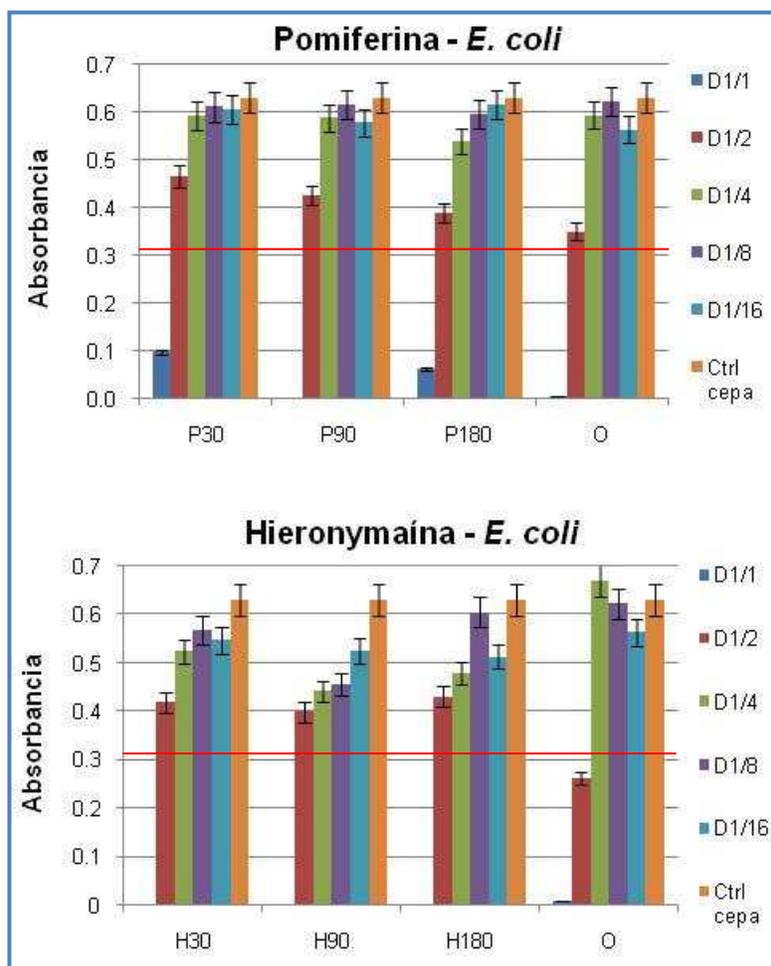
Se realizó un nuevo ensayo pero en este caso, se utilizó una cepa Gram negativa (*E. coli*) y una Gram positiva (*B. cereus*). En cuanto a la placa de *E. coli*, se pudo determinar que los hidrolizados de suero con Hieronymaína y Pomiferina sin dilución (D1/1), generaron una inhibición muy marcada del crecimiento, que en el caso de Hieronymaína fue del 100%. En la Tabla 26 se indican en rojo los valores de absorbancia menores al 50% del valor del control de crecimiento.

Absorbancia Promedio *E. coli*

	D1/1	D1/2	D1/4	D1/8	D1/16	Ctrl cepa	Ctrl medio	Ctrl (-)
<b>P30</b>	<b>0,097</b>	0,465	0,592	0,611	0,605	0,630	0,003	0,000
<b>P90</b>	<b>0,000</b>	0,426	0,588	0,615	0,579			0,000
<b>P180</b>	<b>0,061</b>	0,390	0,538	0,596	0,617			0,000
<b>PO</b>	<b>0,006</b>	0,350	0,594	0,622	0,564			0,000
<b>H30</b>	<b>0,000</b>	0,419	0,524	0,568	0,547			0,000
<b>H90</b>	<b>0,000</b>	0,399	0,442	0,455	0,524			0,000
<b>H180</b>	<b>0,000</b>	0,431	0,480	0,605	0,513			0,000
<b>HO</b>	<b>0,008</b>	<b>0,261</b>	0,669	0,623	0,564			0,000

**Tabla 26.** Se muestran los valores de absorbancia promedio de los duplicados. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, muestra más medio estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento, cepa más medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. PO: Hidrolizados con Pomiferina a tiempo 0 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizado con Hieronymaína a tiempos 30, 90 y 180 minutos. HO: Hidrolizado con Hieronymaína a tiempo 0 minutos.

Se observó que para *E. coli*, los hidrolizados sin dilución, tuvieron valores de crecimiento microbiano inferiores al 15.4% del valor del control de crecimiento, llegando en algunos casos (H30, H90, H180 y P90) a la inhibición total. Como puede verse en la Figura 33, la inhibición disminuyó gradualmente hasta que a dilución 1/4, la absorbancia alcanzó valores del orden del control de crecimiento. El hidrolizado de tiempo cero también generó inhibición a bajas diluciones y no hubo marcadas diferencias entre los distintos tiempos de hidrólisis.



**Figura 33.** Absorbancia en función de la dilución de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaina, en la placa de *E. coli*. La línea roja marca un valor de absorbancia de 0.315 nm, que corresponde al 50% del valor registrado por el control de crecimiento. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, muestra más medio estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento, cepa más medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizados con Hieronymaina a tiempos 30, 90 y 180. O: Hidrolizados cortados a tiempo 0 minutos.

Cuando se utilizó *B. cereus* como microorganismo indicador, los hidrolizados con dilución 1/2, a excepción de P30, generaron mayor inhibición que el resto de las diluciones, y también que las muestras más concentradas.

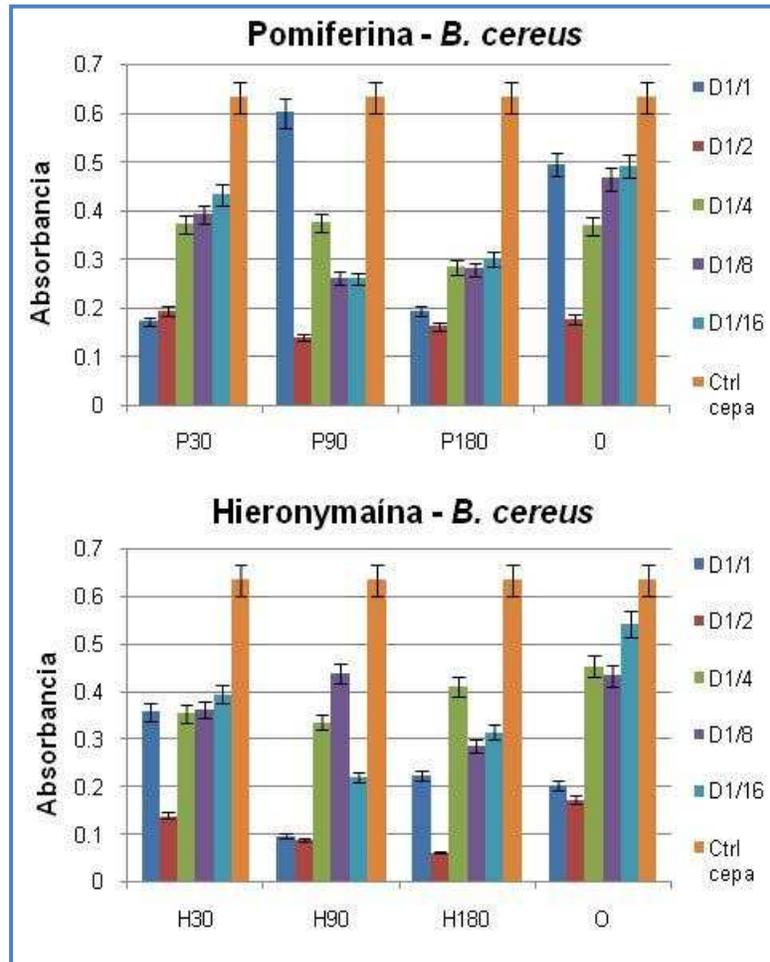
Absorbancia promedio *B. cereus*

Muestra	D1/1	D1/2	D1/4	D1/8	D1/16	Ctrl cepa	Ctrl (-)	Ctrl medio
P30	0,173	0,193	0,371	0,392	0,432	0,633	0,214	0,005
P90	0,601	0,139	0,374	0,261	0,260		0,042	
P180	0,194	0,162	0,283	0,279	0,301		0,000	
P0	0,495	0,177	0,369	0,465	0,491		0,057	
H30	0,357	0,140	0,354	0,362	0,394		0,065	
H90	0,098	0,089	0,336	0,438	0,221		0,000	
H180	0,224	0,063	0,410	0,285	0,315		0,009	
HO	0,202	0,174	0,453	0,433	0,542		0,057	

**Tabla 27.** Se muestran los valores de absorbancia promedio de los duplicados. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, muestra más medio estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento, cepa más medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. P0: Hidrolizados con Pomiferina a tiempo 0 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizados con Hieronimaína a tiempos 30, 90 y 180 minutos. H0: Hidrolizados con Hieronimaína a tiempo 0 minutos.

Los hidrolizados de Pomiferina sin diluir y a dilución 1/2 generaron una inhibición del crecimiento mayor que el resto de las diluciones, excepto por el hidrolizado P90, D1/1, que arrojó un valor de absorbancia comparable al control de crecimiento y P0, D1/1, el cual arrojó un valor de absorbancia mayor que sus diluciones. Se destacaron P180 que generó una inhibición superior al 50% respecto del control, a todas las diluciones ensayadas y H90 a sin diluir que produjo la mayor inhibición del crecimiento con un valor del 84.5%.

Con *B. cereus* no pudo obtenerse una relación entre las diluciones de los hidrolizados y el porcentaje de inhibición como en el caso de *E. coli*. Esto se puede ver claramente en la Figura 34.



**Figura 34.** Absorbancia en función de la dilución de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaína, en la placa de *B. cereus*. D: dilución. Ctrl (-): Control negativo, muestra más medio estéril. Ctrl cepa: Control de crecimiento, cepa más medio estéril. P30, P90 y P180: Hidrolizados con Pomiferina a tiempos 30, 90 y 180 minutos. H30, H90 y H180: Hidrolizados con Hieronimaína a tiempos 30, 90 y 180 minutos. 0': Hidrolizados cortados a tiempo 0 minutos.

En este último ensayo, tanto para *E. coli* como para *B. cereus*, los hidrolizados de tiempo cero generaron inhibición. Una posible explicación para este hecho sería la presencia en los hidrolizados del SLQ, obtenidos tanto con Pomiferina como con Hieronymaína, de péptidos provenientes de las proteínas de la leche liberados durante el proceso de coagulación y que quedaron en la fracción correspondiente al suero. Si

bien se ha demostrado en otros trabajos (Pellegrini *et. al.*, 1999; Pellegrini *et. al.*, 2001; Van der Kraan *et. al.*, 2004; Biziulevicius *et. al.*, 2005;) la obtención de péptidos con actividad antimicrobiana a partir de la hidrólisis de proteínas del lactosuero con distintas enzimas, en ellos se trabaja a partir de hidrolizados de una única proteína purificada y no de una mezcla de composición tan compleja como en nuestro caso. De todas maneras los ensayos realizados en esta sección darían la pauta de que la hidrólisis de las proteínas presentes en el SLQ, podría generar péptidos con actividad antimicrobiana.

# *CONCLUSIONES*

Se obtuvieron preparaciones proteolíticamente activas a partir de frutos de *Maclura pomífera* y *Bromelia hieronymi*, llamadas “extractos crudos”, que presentaron actividades específicas de  $7,9 \pm 0,8$  y  $9,2 \pm 0,6$  Ucas/mg respectivamente.

Se ensayó la capacidad del extracto de Pomiferina para coagular leche descremada reconstituida, determinándose que el tiempo de coagulación disminuye a medida que aumenta la temperatura y que guarda una relación lineal con la dilución del extracto crudo.

Los sueros obtenidos coagulando leche con Hieronymaína y Pomiferina presentaron perfiles peptídicos característicos cuando fueron analizados por SDS-PAGE y mostraron la presencia de actividad antioxidante cuando se empleó el método del  $\beta$ -caroteno. Los valores obtenidos fueron para el suero sin filtrar obtenido con Pomiferina,  $50 \pm 0,26\%$  y para el suero filtrado  $45 \pm 0,18\%$ , mientras que para los sueros obtenidos con Hieronymaína los porcentajes de actividad antioxidante fueron  $49 \pm 2,8\%$  (suero sin filtrar) y  $48 \pm 1,2\%$  (suero filtrado). Estos valores se hallaron comprendidos entre los correspondientes a soluciones patrón de ácido ascórbico de 0,01 y 0,1 g/ml, mientras que el suero obtenido por coagulación con quimosina presentó valores más bajos. Se concluyó que la actividad antioxidante podría ser atribuida a pequeños péptidos producto de la hidrólisis de las proteínas lácteas.

El suero filtrado obtenido por coagulación de leche con Pomiferina, con una concentración peptídica de 13,5 mg/ml, inhibe en un 25,8% la actividad de la ECA y este valor es más del doble del que se obtiene para el suero obtenido con Quimosina (12,0%). Se estimó que la  $IC_{50}$  para el primero tiene un valor de 24,8 mg/ml.

Se concluyó que el empleo de Hieronymaína o de Pomiferina como coagulantes de la leche, permitiría utilizar fitopeptidasas de la flora autóctona o de especies cultivadas en Argentina como alternativa al uso de quimosina, además de brindar la posibilidad de aprovechar el lactosuero de descarte por la presencia de actividad antioxidante y/o inhibitoria de la ECA.

Se realizó la hidrólisis del lactosuero comercial utilizando los PER de Pomiferina y Hieronymaína, verificando el efecto de diversas condiciones de reacción mediante la visualización de bandas peptídicas por SDS-PAGE y el grado de hidrólisis. A 45°C y luego de 180 min de proteólisis éste último resultó ser  $8,5 \pm 0,5\%$  para el hidrolizado de suero con Pomiferina y  $4,4 \pm 0,2\%$  para el hidrolizado obtenido con Hieronymaína.

Se verificó la presencia de actividad antihipertensiva in vitro en los hidrolizados de SLQ obtenidos con las dos enzimas, siendo máxima para los de 180 minutos. La inhibición de la ECA para los hidrolizados obtenidos con Pomiferina fue de 92,3% mientras que para los de Hieronymaína fue de 86,20%. Los valores de  $IC_{50}$  de estos hidrolizados fueron 2,97 mg/ml y 1,63 mg/ml, respectivamente.

El análisis de los hidrolizados por HPLC-RP mostró un patrón de péptidos diferente para cada tiempo de hidrólisis, hecho que podría indicar que los péptidos que se van formando no son estables sino que van siendo degradados por las peptidasas.

Como resultado de la espectrometría de masas y el análisis con el programa FindPept de los hidrolizados con Pomiferina y Hieronymaína de 90 minutos, se obtuvieron secuencias de péptidos que no se encontraron descritas en la bibliografía, por lo tanto la actividad inhibitoria de la ECA podría deberse a la presencia de péptidos aún no estudiados.

A través del análisis bioinformático de las principales proteínas del lactosuero y de péptidos antimicrobianos hallados en la bibliografía, se concluyó que las proteínas del lactosuero analizadas contienen regiones en su secuencia con características fisicoquímicas y estructurales que les permitirían ejercer actividad antimicrobiana al ser liberadas por hidrólisis.

En los ensayos de difusión en agar se observó que los hidrolizados de SLQ produjeron halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aunque no pudo establecerse una relación directa entre el tiempo de hidrólisis y el diámetro del halo de inhibición.

Los resultados de los ensayos de dilución en microplaca indican que los hidrolizados de SLQ obtenidos por tratamiento con Pomiferina y Hieronymaína, disminuirían el crecimiento de las cepas de *E. coli* y *B. cereus* ensayadas.

## ANEXO I

Análisis con el programa FindPept ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), de las principales masas moleculares obtenidas por MALDI – TOF de los péptidos presentes en los hidrolizados del lactosuero tratados con Pomiferina y Hieronymaína.

En estas tablas, **User mass** significa masa del péptido que se esta buscando, es decir, la masa del pico del a Figura 16. **DB mass**, es la masa de la secuencia incluyendo modificaciones post-traduccionales que contiene en la proteína de la cual proviene, calculadas utilizando las bases de datos de masas moleculares.  **$\Delta$ mass** es la diferencia de masa entre la **User mass** y **DB mass**. **Peptide** es la secuencia del péptido, y los aminoácidos entre paréntesis y en gris no corresponden a ella, sino que indican a que aminoácidos están unidos los extremos del péptido en la secuencia de la proteína. **Position** es la posición del péptido dentro de la secuencia de la proteína de la cual proviene.

Para el hidrolizado obtenido con **Pomiferina**, las posibles secuencias de los picos principales se detallan en las tablas siguientes. Antes de cada una, se indica a partir de que proteína del suero lácteo se realizó el análisis.

TABLA I: ANÁLISIS DE LACTOFERRINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (Da)	peptide	position
798.529	798.367	-0.162	(P)YLSWTE(S)	127-132
798.529	798.378	-0.150	(S)SREPYF(G)	177-182
798.529	798.422	-0.107	(C)HTGLGRSA(G)	108-115
798.529	798.447	-0.082	(V)PVLAENR(K)	401-407
798.529	798.447	-0.082	(P)PGQRDLL(F)	285-291
929.622	929.473	-0.149	(D)GGYIYTAGK(C)	388-396
929.622	929.495	-0.126	(C)HLAVAPNHA(V)	580-588
929.622	929.530	-0.091	(R)IPSKVDSAL(Y)	302-310
1060.872	1060.473	-0.399	(F)SQSCAPGADPK(S)	480-490
1060.872	1060.473	-0.399	(S)QSCAPGADPKS(R)	481-491
1060.872	1060.484	-0.388	(K)SCHTAVDRTA(G)	448-457
1060.872	1060.509	-0.362	(D)QLDKCVPNS(K)	502-511
1060.872	1060.520	-0.351	(F)GKNGKNCPDK(F)	611-620

1060.872	1060.527	-0.345	(K)NLRETAEEV(K)	322-330
1060.872	1060.546	-0.326	(Q)GLDKCVPNSK(E)	503-512
1060.872	1060.615	-0.257	(D)SALGFLRIPS(K)	295-304
1060.872	1060.618	-0.253	(Y)VTAIANLKKC(S)	658-667
1256.951	1256.616	-0.335	(A)LNLDGGYIYTAG(K)	384-395
1256.951	1256.653	-0.298	(Q)LQGRKSCHTGLG(R)	101-112
1256.951	1256.667	-0.284	(W)NIPMGLIVNQTG(S)	460-471
1256.951	1256.671	-0.280	(V)LAENRKSSKHS(S)	403-413
1256.951	1256.736	-0.214	(D)PYKLRPVAAEI(Y)	63-73
1768.421	1767.928	-0.493	(C)LAKLGGRPTYEEYLGT(E)	640-655
1768.421	1767.932	-0.488	(V)LLHQQALFGKNGKNCP(D)	603-618
1768.421	1767.935	-0.486	(V)PVLAENRKSSKHSSLD(C)	401-416
1768.421	1767.950	-0.470	(K)AQEKFGKNKSRSFQL(F)	266-280
1768.421	1768.705	0.284	(E)NQCACSSREPYFGYSG(A)	171-186
1768.421	1768.738	0.316	(K)CQQWSQQSGQNVTCAT(A)	350-365
1768.421	1768.898	0.477	(S)CHTGLGRSAGWIIPMGI(L)	107-123
2039.944	2039.989	0.044	(A)EKKADAVTLDGGMVFEACR(D)	43-61
2039.944	2039.992	0.047	(C)LQDGAGDVAFVKETTVFEN(L)	191-209
2039.944	2039.992	0.047	(L)QDGAGDVAFVKETTVFENL(P)	192-210
2039.944	2040.011	0.066	(A)DALNLDGGYIYTAGKCGLVP(V)	382-401
2039.944	2040.011	0.066	(L)DGGYIYTAGKCGLVPVLAEN(R)	387-406
2039.944	2040.028	0.084	(L)VLKGEADALNLDGGYIYTAG(K)	376-395
2039.944	2040.055	0.110	(Q)THYYAVAVVKKGSNFQLD(Q)	82-99
2039.944	2040.092	0.147	(Q)LQGRKSCHTGLGRSAGWII(P)	101-119
2039.944	2040.102	0.157	(G)KCGLVPVLAENRKSSKHSS(L)	396-414
2364.339	2364.114	-0.225	(F)ENLPEKARDQYELLCLNNS(R)	208-227
2364.339	2364.118	-0.221	(F)GYSGAFKCLQDGAGDVAFVK ETT(V)	183-205
2364.339	2364.248	-0.090	(E)WFKCRRWQWRMKKLGAPS(I)	8-25
2364.339	2364.264	-0.075	(I)TCVRRFALECIIRAIAEKKA D(A)	27-47
2364.339	2364.340	0.000	(S)HAVVARSVDGKEDLIWKLLS K(A)	245-265

TABLA II: ANALISIS DE  $\alpha$ -LACTALBÚMINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (Da)	peptide	position
798.529	798.487	-0.041	(L)LVGILFH(A)	9-15
929.622	929.386	-0.236	(I)CNISCDKF(L)	92-99
2039.944	2039.967	0.022	(Q)AIVQNNDSTEYGLFQINN(K)	59-76

TABLA III: ANALISIS DE  $\beta$ -LACTOGLBULINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (Da)	peptide	position
<b>929.622</b>	929.530	-0.091	(N)ENKVLVLD(T)	105-112
<b>929.622</b>	929.545	-0.076	(L)EILLQKW(E)	71-77
<b>929.622</b>	929.545	-0.076	(E)ILLQKWE(N)	72-78
<b>1256.951</b>	1256.721	-0.230	(F)KIDALNENKVL(V)	99-109
<b>2039.944</b>	2040.011	0.066	(G)LDIQKVAGTWYSLAMAASD(I)	26-44
<b>2039.944</b>	2040.011	0.066	(L)DIQKVAGTWYSLAMAASDI(S)	27-45
<b>2364.339</b>	2364.159	-0.180	(K)ALPMHIRLSFNPTQLEEQCH(I)	158-177

El análisis para el hidrolizado con **Hieronymaína** se detalla a continuación (tablas IV a VI), como en el caso anterior, antes de cada una se especifica para qué proteína se realizó el análisis.

TABLA IV: ANÁLISIS DE LACTOFERRINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (Da)	peptide	position
<b>552.790</b>	552.303	-0.487	(A)LYLGS(R)	310-314
<b>552.790</b>	552.314	-0.475	(S)RYLT(T)	315-318
<b>552.790</b>	553.229	0.438	(V)TCATAS(T)	362-367
<b>552.790</b>	553.229	0.438	(T)CATAST(T)	363-368
<b>552.790</b>	553.241	0.450	(T)HYA(V)	83-86
<b>552.790</b>	553.250	0.460	(Y)EEYL(G)	650-653
<b>552.790</b>	553.255	0.465	(T)GAFRC(L)	520-524
<b>565.162</b>	565.229	0.067	(K)YYGY(T)	515-518
<b>565.162</b>	565.265	0.103	(N)VTCATA(S)	361-366
<b>773.061</b>	773.335	0.274	(T)YEEYLG(T)	649-654
<b>773.061</b>	773.379	0.317	(S)SKHSSLD(C)	410-416
<b>773.061</b>	773.401	0.340	(A)GWIPMG(I)	116-122
<b>773.061</b>	773.426	0.365	(A)KNLNRE(D)	554-559

<b>773.061</b>	773.467	0.405	(D)PYKLRP(V)	63-68
<b>928.181</b>	928.354	0.172	(L)DGGMVFEAC(R)	52-60
<b>928.181</b>	928.478	0.297	(Q)LQGRKSCH(T)	101-108
<b>928.181</b>	928.500	0.318	(L)HQQALFGK(N)	605-612
<b>928.181</b>	928.521	0.340	(T)RKPVTEAQ(S)	570-577
<b>928.181</b>	928.594	0.412	(C)IRAIAEKK(A)	38-45
<b>1202.033</b>	1201.574	-0.458	(A)KFFSASCVPCI(D)	143-153
<b>1202.033</b>	1201.596	-0.437	(F)QLFGSPPGQRD(L)	279-289
<b>1202.033</b>	1201.599	-0.433	(Q)SCAPGADPKSRL(C)	482-493
<b>1202.033</b>	1201.599	-0.433	(L)LCLNNSRAPVD(A)	222-232
<b>1202.033</b>	1201.617	-0.415	(L)DGTRKPVTEAQ(S)	567-577
<b>1202.033</b>	1201.622	-0.411	(G)RKSCHTGLGRS(A)	104-114
<b>1202.033</b>	1201.709	-0.324	(W)RMKKLGAPSIT(C)	17-27
<b>1766.300</b>	1765.837	-0.463	(S)REPYFGYSGAFKCLQ(D)	178-192
<b>1766.300</b>	1765.901	-0.399	(A)GDVAFVKETTVFENLP(E)	196-211
<b>1766.300</b>	1765.985	-0.315	(G)FLRIPSKVDSALYLG(S)	299-314
<b>1766.300</b>	1766.733	0.432	(I)VNQTGSCAFDEFFSQS(C)	467-482
<b>1766.300</b>	1766.784	0.483	(R)QAYPNLCQLCKGEGEN(Q)	156-171
<b>1766.300</b>	1766.784	0.483	(Q)AYPNLCQLCKGEGENQ(C)	157-172
<b>2020.137</b>	2019.947	-0.189	(A)LCAGDDQGLDKCVPNSKEK(Y)	496-514
<b>2020.137</b>	2019.998	-0.138	(V)KETTVFENLPEKADRQ(Y)	202-218
<b>2020.137</b>	2020.082	-0.054	(A)QVPSHAVVARSVDGKEDLI(W)	241-259
<b>2020.137</b>	2020.086	-0.050	(E)GYLAVAVVKKANEGLTWNS(L)	424-442
<b>2020.137</b>	2020.090	-0.047	(R)AFALECIRAIAEKKADAVT(L)	32-50

TABLA V: ANALISIS DE  $\alpha$ -LACTALBÚMINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (daltons)	peptide	position
<b>552.790</b>	552.303	-0.487	(M)SFVSL(L)	3-7
<b>565.162</b>	565.210	0.047	(N)NDSTE(Y)	64-68
<b>565.162</b>	565.265	0.103	(N)ISCDK(F)	94-98
<b>565.162</b>	565.298	0.136	(K)VGINY(W)	118-122
<b>773.061</b>	773.379	0.317	(Q)AIVQNND(S)	59-65
<b>773.061</b>	773.415	0.354	(D)TQAIVQN(N)	57-63
<b>773.061</b>	773.452	0.390	(F)RELKDL(K)	29-34
<b>1202.033</b>	1202.478	0.445	(V)CTAFHTSGYDT(Q)	47-57
<b>1766.300</b>	1765.814	-0.486	(T)AFHTSGYDTQAIVQNN(D)	49-64
<b>1766.300</b>	1765.833	-0.467	(L)FQINNKIWCKDDQN(P)	72-85
<b>1766.300</b>	1766.021	-0.278	(S)LLLVGILFHATQAEQL(T)	7-22

TABLA VI: ANALISIS DE  $\beta$ -LACTOGLBULINA

User mass	DB mass	$\Delta$ mass (Da)	peptide	position
<b>565.162</b>	565.192	0.030	(N)DECAQ(K)	80-84
<b>565.162</b>	565.229	0.066	(L)AMAASD(I)	39-44
<b>565.162</b>	565.247	0.085	(S)LVCQC(L)	133-137
<b>565.162</b>	565.247	0.085	(L)VCQCL(V)	134-138
<b>565.162</b>	565.247	0.085	(V)CQCLV(R)	135-139
<b>565.162</b>	565.262	0.099	(L)SFNPT(Q)	166-170
<b>773.061</b>	773.368	0.306	(S)AEPEQSL(V)	127-133
<b>773.061</b>	773.495	0.434	(M)KCLLLAL(A)	2-8
<b>928.181</b>	928.408	0.227	(W)YSLAMAASD(I)	36-44
<b>928.181</b>	928.423	0.242	(A)GTWYSLAM(A)	33-40
<b>928.181</b>	928.510	0.328	(C)LVRTPEVD(D)	138-145

---

<b>928.181</b>	928.546	0.365	(A)LNENKVLV(L)	103-110
<b>928.181</b>	928.546	0.365	(L)NENKVLVL(D)	104-111
<b>1766.300</b>	1766.739	0.439	(L)VCMENSAEPEQSLVCQ(C)	121-136

## REFERENCIAS

- Adler-Nissen J. (1979) "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid" *J. Agric. Food Chem.* **27**:1256-1262.
- Adler-Nissen J. (1986), "Enzymic hydrolysis of food protein". London, Uk, Elsevier.
- Alais, Ch., (1985), *Ciencia de la leche*. Madrid: Editorial Reverté.
- Alvarado Carrasco, Carlos y Guerra, Marisa. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An Venez Nutr*, jun. 2010, vol.23, no.1, p.45-50. ISSN 0798-0752.
- Barret A. J., (2001), "Proteolytic enzymes: nomenclature and classification", en *Proteolytic Enzymes. A practical approach*. 2nd ed. R. Beynon, J. S. Bond, eds., Oxford University Press, Great Britain.
- Basso N., Paglia N., Stella I., Cavanagh E., Ferder L., Lores Arnaiz M.R. & Inserra F. (2005) "Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging". *Regul. Pept.* **128**:247-252.
- Benitez, Ricardo; Ibarz, Albert y Pagan, Jordi. Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím. Clín. latinoam.* [online]. 2008, vol.42, n.2 [citado 2012-04-12], pp. 227-236. Disponible en: <[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1851-6114.
- Bhalodi M., Shukla S. & Saluja A.K. (2008) "Research Article In-vitro Antioxidant activity of the flowers of *Ipomoea aquatica* Forsk" *Pharmacognosy Magazine* **4**: 226-230.
- Biziulevicius, Gediminas; Kislukhina, Olga; Kazlauskaite, Jurgita & Zukaite, Vilhelmina. (2008) "Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a 'cause and effect' theory of bifunctionality". *FEMS Immunol Med Microbiol* **46** (2006) 131-138.
- Bradford, M.B. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Bruno, M.A., Pardo, M.F., Caffini N.O. & López, L.M.I. (2002). "Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)", *Acta Farm. Bonaerense.* **21**: 51-6.

- Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2003). "Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Protein Chemistry*, 22(2), 127–134.
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2006). Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez. *The Protein Journal*, 25(3), 224–231.
- Bruno, M.A., S.A.Trejo, N.O.Caffini & López, Laura M.I. (2008) "Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez". *The Protein Journal*. **27**: 426-433.
- Caffini, N.O., Natalucci, C.L., & Salas Bravo, C.E., (2009), "Tipos de proteasas, distribución y rol en los vegetales" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones industriales". - 1a ed. - Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED, 2009. Editor: Dr. Néstor Caffini. ISBN 978-987-96413-6-1, págs. 3-13.
- Calvo, M., (2009), "Bioquímica de los alimentos". <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/lactosuero.html> 21/05/2012.
- Carmona, A. K., Schwager, S. L., Juliano, M. A., Juliano, L., & Sturrock, E. D. (2006), "A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay". *Nature Protocols*, 1, 1971e1976.
- Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). "Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers". *International Dairy Journal*, 17, 1393e1400.
- Chen, Y., Guarnieri, M., Vasil, A., Vasil, M., Mant, C., Hodges, R., (2007), "Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 2007, Vol. 51, No. 4, p. 1398–1406.
- Cole C, Barber JD & Barton GJ. *Nucleic Acids Res.* 2008. 35 (suppl. 2) W197-W201.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deléage, G., (2000), "Network Protein Sequence Analysis", 2000, March Vol. 25, No 3 [291]:147-150.
- Correa D. A., Gelificación fría de las proteínas del lactosuero, 2010, ReCiTeIA, ISSN-2027-6850.

- Drago Serrano, M. E., "Actividades antibacterianas de lactoferrina", 2006. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, volumen 26, nº 2, (2): 58-63, abril-junio 2006.
- Engler, V. (2003) Reciclando los desechos de la leche, Centro de Divulgación Científica - SEGBE - FCEyN. Publicado en el sitio: <http://www.universia.com.ar>, visitado en junio de 2009.
- Farrell H, Jimenez-Flores R, Bleck G, Brown E, Butler J, Creamer L, Hicks C, Hollar C, Ng-Kwai-Hang K, Swaisgood H. (2004). Nomenclature of the proteins of cow's milk. Sixth revision. *J Dairy Sci* 87:1641-1674.
- Garnier J, Gibrat J-F, Robson B, "GOR secondary structure prediction method version IV". *Methods in Enzymology*, 1996, R.F. Doolittle Ed., vol 266, 540-553.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., (2005); "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server"; en *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 2005, pp. 571-607 John M. Walker (ed).
- Gil Zamora M., (2007), "Industrialización de Proteínas del Lactosuero". *Ingeniería de Alimentos, Revista ReCiTeIA v.8, nº 1, 2007*. Universidad del Valle, Cali – Colombia. <http://revistareciteia.es.tl/>.
- González, M., Silva, H., Mascorro, J., (2005), "Ensayo in vitro del Péptido antimicrobiano Melitina contra diferentes bacterias fitopatógenas". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2005, ISSN: 0185-3309, Vol 23, Nº 002, pp. 176 – 182.
- Grasselli, M., A. A. Navarro, H. M. Fernández, M. V. Miranda, S. A. Camperi y O. Cascone (1997), ¿Qué hacer con el suero del queso?, *Ciencia Hoy*, Vol. 43, pp. 8.
- Haque, Emily and Chand, Rattan (2006). Milk protein derived bioactive peptides. [On-line]. Available from: <http://www.dairyscience.info/index.php/exploitation-of-anti-microbial-proteins/111-milk-protein-derived-bioactive-peptides.html?showall=1&limitstart=> . Accessed: 19 May, 2012.
- Hartley, B.S. (1960) "Proteolytic enzymes", *Annual Review of Biochemistry*. **29**: 45-72.
- Uhlrig, H. (1998). "Industrial enzymes and their applications", Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., NY, Toronto, págs. 2-5.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R., (2006), "Peptide Antimicrobial Agents", *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 19, No. 3, July 2006, p. 491–511.

- Junier, T., Pagni, M., (2000), Dotlet: diagonal plots in a web browser. *Bioinformatics*. 2000 Feb; 16(2):178-9. , con matrices pam 250.
- Kitts D.D. & Weiler K. (2003), "Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery". *Current Pharmaceutical Design*. **9**:1309-1323.
- Kumari, M., Sharma, A., & Jagannadham, M. V. (2010). "Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a milk-clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 8027e8034.
- Kumura H., Ishido T., & Shimazaki K. (2011), "Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source". *J. Dairy Sci.* **94**: 657–667  
doi: 10.3168/jds.2010-3587.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG, *Bioinformatics* 2007 **23**(21): 2947-2948.
- López, L. M. I., Natalucci, C. L., Caffini, N. O., & Curotto, E. (1993). Isolation and parcial characterization of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* ("Osage orange") fruits. *Acta Alimentaria*, **22**, 131e142;  
Rudenskaya, G. N., Bogdanova, E. A., Revina, L. P., Golovkin, B. N., & Stepanov, V. M. (1995). Macluralisin e a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.)Schneid. *Planta*, **196**, 174e179.
- López, L. M. I., Brullo, A., Natalucci, C. L., Caffini, N. O., Sorgentini, D., & Wagner, J. (1998). Thermal behavior, solubility and structural properties of soy concentrate hydrolyzed by new plant proteases. *Journal of Food Biochemistry*, **22**, 125e141.
- Mc Donald, J.K., (1985), "An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification". *Histochemical Journal*. **17**: 773-785.
- Medrano J, Aguilar-Córdova E., (1990), "Polymerase chain reaction amplification of bovine-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis". *Animal Biotech* **1** (1):73-77.
- Millán F., Vioque J., 2005, "Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional", ISSN 1577-5917, Editor: centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación. Instituto de la grasa (Sevilla).
- Muñoz de Malajovich, María Antonia, (2006), Capítulo IV "Las Enzimas y los Anticuerpos" en "Biotecnología". - 1ª Ed. – Bernal. Universidad Nacional de Quilmes. 2006. Págs 71 a 86.

- Natalucci C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni y N.O. Caffini (1985). "Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* **4**: 93-8.
- Nicorescu, I., C. Loisel, A. Riaublanc, C. Vial, G. Djelveh, G. Cuvelier, J. Legrand. (2009), "Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams". *Food Hydrocolloids* 23(4): 1209–1219.
- Nielsen P.M., Petersen D. & Dambmann C. (2001) "Improved method for determining food protein degree of hydrolysis" *Food Chem. Toxicol.* **66**:642-646
- Nielsen, P. M. & H. S. Olsen (2002), "Enzymic modification of food proteín". En "Enzymes in food technology", R. Whitehurst & B. A. Law, eds.
- PDB ID: 1HFZ. Pike, A.C., Brew, K., Acharya, K.R., (1996), "Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase". *Structure* **4**: 691-703.
- PDB ID: 2Q2M. Vijayalakshmi, L., Krishna, R., Sankaranarayanan, R., Vijayan, M., (2007), "An asymmetric dimer of beta-lactoglobulin in a low humidity crystal form--structural changes that accompany partial dehydration and protein action". *Proteins* 71: 241-249.
- PDB ID: 3KJ7. Mir, R., Kumar, R.P., Singh, N., Vikram, G.P., Sinha, M., Bhushan, A., Kaur, P., Srinivasan, A., Sharma, S., Singh, T.P., (2010), "Specific interactions of C-terminal half (C-lobe) of lactoferrin protein with edible sugars: binding and structural studies with implications on diabetes". *Int.J.Biol.Macromol.* 47: 50-59.
- Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., von Fellenberg R., (1999). "Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine K-lactalbumin molecule". *Biochimica et Biophysica Acta* 1426 (1999) 439^448.
- Pellegrini A., Dettling C., Thomas U., Hunziker P., (2001). "Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine L-lactoglobulin". *Biochimica et Biophysica Acta* 1526 (2001) 131^140.
- Peña-Ramos E.A. & Xiong Y.L. (2001) "Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in aliposomal system" *J. Dairy Sci.* **84**:2577-2583.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (2004). "Introduction: clan PB containing N-terminal nucleophile peptidases", en "Handbook of Proteolytic Enzymes", 2nd Ed., págs. 2047-9. Elsevier, London.

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A., (2012), "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors". *Nucleic Acids. Res* 40, D343-D350.
- Shägger & Von Jagow, (1987), "Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Anal. Biochem.* **166**: 368-79.
- Singh, A. N., & Dubey, V. K. (2011). "Exploring applications of procerain B, a novel protease from *Calotropis procera*, and characterization by N-terminal sequencing as well as peptide mass fingerprinting". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 573e580.
- Spellman, D., G. O'Cuinn and R. FitzGerald, (2009), "Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins". *Food Chemistry* 114(2): 440–446.
- Taverna, M. (2002), *La calidad: ¿por qué y para qué?*, Manual de referencia para el logro de leche de calidad. INTA Rafaela, Argentina, 1° Edición, pp. 7-13.
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O' Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P. J., (2009), "Application of natural antimicrobials for food preservation", 2009, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5987-6000.
- Torres-Llanéz M., Vallejo-Córdoba B., González-Córdova A., (2005), "Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche", *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 2005, Vol. 55 – Número 2.
- Vallés D., Furtado S., Hernández M., Salas Bravo C. E. y Cantera A. M. B., (2009), "Potencialidades tecnológicas y perspectivas de aplicación" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones industriales". - 1a ed. - Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED, 2009. Editor: Dr. Néstor Caffini. ISBN 978-987-96413-6-1, págs. 57-66.
- Van der Kraan M., Groenink J., Nazmi K., Veerman E., Bolscher J., Nieuw Amerongen A., (2004). "Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin". *Peptides* 25 (2004) 177–183.
- [Vioque, J.](#), [Millán, F.](#), Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud, (2005), Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación, ISSN 1577-5917.
- Vioque J., Pedroche J., Yust M., Lqari H., Megías C, Girón Calle J., Alaiz M., Millan F, (2006), "Péptidos Bioactivos en Proteínas Vegetales de Reserva, *Brazilian Journal Food Technology*, III JIPCA, Enero 2006.
- Walsh, G. (2004). *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. Ed: John Wiley & Sons, LTD.pag.:420-435.

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009), "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench". *Bioinformatics* **25** (9) 1189-1191 [doi: 10.1093/bioinformatics/btp033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033).