

CAPÍTULO 2

Péptidos Bioactivos de Fuentes Vegetales: Un Nuevo Ingrediente para Alimentos Funcionales

Erika Berenice León Espinosa, Cristian Jiménez-Martínez, Gloria Dávila-Ortiz

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala. Col. Casco de Sto. Tomás. Del. Miguel Hidalgo. C.P.11340. México, Distrito Federal.

gatca21@hotmail.com, crisjm_99@yahoo.com, gdavilao@yahoo.com

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.288>

Referenciar este capítulo

León-Espinosa, E.B., Jiménez-Martínez, C., & Dávila-Ortiz, G. (2015). *Péptidos bioactivos de fuentes vegetales: Un nuevo ingrediente para alimentos funcionales*. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 37-71.

Resumen

En la actualidad el uso de ingredientes en alimentos y alimentación especializada, está tomando un nuevo enfoque, ya que los consumidores tienen un creciente interés por su salud y bienestar, derivado de la preocupación por incluir en su alimentación diaria, alternativas que contribuyan a elevar su nivel de satisfacción en ambos aspectos; por lo que la industria de alimentos se está enfocando en buscar soluciones que les permitan satisfacer estas necesidades, lo cual brinda la oportunidad para el desarrollo de ingredientes funcionales que además de enriquecer o fortalecer las propiedades sensoriales y físicas de los alimentos, poseen uno o más componentes nutricionales que benefician diversas funciones del organismo, al mismo tiempo que ayuda a prevenir y contrarrestar el riesgo de algunas enfermedades.

Algunos componentes como antioxidantes, vitaminas, proteínas y otros nutrientes esenciales pueden ser encontrados naturalmente en alimentos y bebidas; un ejemplo de estos nutrientes son los péptidos bioactivos que son mezclas de fracciones de proteínas y cadenas peptídicas, que se obtienen a partir de proteínas de origen animal y vegetal, por medio de diferentes procesos como fermentación, hidrólisis química o enzimática; los cuales tienen una amplia gama de aplicaciones como ingredientes de alimentos, hasta su empleo como fuente de nitrógeno en la preparación de dietas viables para administración parenteral, fórmulas hipoalergénicas infantiles, alimentos bajos en calorías y bebidas para deportistas. Además presentan diferentes actividades biológicas tales como: antioxidante, antihipertensivos, antimicrobianos, anticancerígenos, etc.

Una vez obtenidos los péptidos bioactivos, es necesaria su purificación a través de métodos como la ultrafiltración, separación cromatográfica o la nanofiltración; así como por métodos cromatográficos para determinar la secuencia de aminoácidos que lo componen. Es por todo lo anterior que en este capítulo se abordará la obtención de los péptidos bioactivos así como su purificación y caracterización.

Palabras clave

Ingredientes funcionales, proteínas, péptidos bioactivos, purificación.

1. Alimentos Funcionales

Durante los últimos 20 años los hábitos dietéticos han variado. Actualmente, no sólo se trata de cubrir necesidades y evitar alimentos perjudiciales, sino de buscar aquellos que influyan de manera positiva en nuestra salud y ayuden a prevenir enfermedades. Son muchos los factores que han contribuido en esta revolución dietética. Por un lado se demostró que una mala alimentación, rica en grasa animal saturada y productos refinados, se relacionaba con una alta morbilidad y mortalidad ocasionadas por enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes; en contraste a este panorama, también se ha observado que personas que siguen dietas con un alto contenido en alimentos de origen vegetal (leguminosas, frutas y verduras) tenían un riesgo más bajo de presentar enfermedades cardiovasculares y cáncer que personas que seguían dietas pobres en estos alimentos (Gimeno-Creus, 2003)

Trabajos científicos han avalado a constituyentes de los alimentos como ingredientes de interés para la salud: componentes derivados de las proteínas, lípidos, oligosacáridos, vitaminas, antioxidantes, entre otros. En las sociedades industrializadas, se demandan cada vez más alimentos que proporcionen beneficios para la salud o que permitan reducir el riesgo de sufrir enfermedades, mismos que han sido denominados como alimentos funcionales o biofuncionales (Araya & Lutz, 2003)

Un alimento puede considerarse funcional si además de sus cualidades nutricionales, “afecta” beneficiosamente a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad (Palou & Serra, 2000)

Los alimentos funcionales implican diversas posibilidades como:

- Nutrientes añadidos
- Aumento en la proporción de los mismos y
- Nuevos procesos de obtención

El diseño de un alimento funcional debe estar mediatizado por el impacto que determinados nutrientes ejercen sobre funciones del organismo humano. Sin embargo, es necesario conocer los mecanismos de acción, las dosis adecuadas y además comprobar la objetividad de su eficacia para validar definitivamente la utilidad de su recomendación.

La estrategia para crear un alimento funcional se apoya esquemáticamente, en las siguientes premisas:

- Inclusión de un componente nuevo, de eficacia conocida (ácidos grasos $\omega 3$)
- Aumentar elementos ya presentes (calcio en lácteos)
- Competir en la absorción y biodisponibilidad (adición de elementos estructurales no peptídicos para mejorar actividades biológicas)
- Sustitución de principios inmediatos (grasas por hidratos de carbono)

Se ha demostrado que existe una gran variedad de microcomponentes de la dieta que pueden influir en la capacidad de un individuo para alcanzar todo su potencial genético y minimizar el riesgo de enfermar. La respuesta del organismo ante el consumo de un alimento funcional depende de factores genéticos, el estado fisiológico y la composición de la dieta. En la Tabla 1 se muestran los tipos de alimentos funcionales y sus efectos.

El desarrollo de los alimentos funcionales está en continuo crecimiento debido a la demanda de estos productos por parte del consumidor y también porque se asocian con la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer, la hipertensión, sobrepeso, osteoporosis, enfermedades del corazón, diabetes, entre otras (Cortés, Chiralt & Puente, 2005).

Otros factores que contribuyen al crecimiento de los alimentos funcionales son el envejecimiento de la población, aumento de costos en la salud, la autonomía en el cuidado de la salud y los cambios en la regulación de los alimentos. Es por lo anterior, que es necesario estudiar más componentes que puedan fungir como ingredientes funcionales por lo que en las siguientes secciones nos enfocaremos a los péptidos bioactivos y su aplicación.

Tabla 1. Tipos de alimentos funcionales y efectos sobre el organismo o algunas funciones biológicas

| Ingrediente funcional | Efectos | Ejemplos |
|------------------------------|--|--|
| Prebióticos | Mejoran la función intestinal | Lactobacilos (Yogures bio) |
| Prebióticos | Favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas. | Fructo-oligosacáridos (cereales integrales) |
| Vitaminas | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis | Vitamina B ₆ , B ₁₂ , ácido fólico, vitamina D y K |
| Minerales | Reducen el riesgo de osteoporosis y fortalecen el sistema inmune | Calcio, magnesio, zinc |
| Antioxidantes | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores | Vitamina C y E, carotenos, flavonoides, y polifenoles, hidrolizados y péptidos antioxidantes |
| Ácidos grasos | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores. Reducen los síntomas de la menopausia | Ácidos grasos omega 3 (Lácteos, huevo) |
| Fitoquímicos | Reducen los niveles de colesterol y los síntomas de la menopausia | Fitoesteroles, isoflavonas y lignina |

Fuente: Serra & Aranceta (2005).

2. Hidrolizados Proteínicos y Péptidos Bioactivos

Los hidrolizados proteínicos son mezclas de fracciones de proteínas y cadenas peptídicas que pueden obtenerse por hidrólisis enzimática, química, fermentación microbiana y/o fraccionamiento o enriquecimiento de péptidos; los cuales tienen una amplia gama de aplicaciones como ingredientes en alimentos, hasta su empleo como fuente de nitrógeno en la preparación de dietas viables para administración parenteral, fórmulas hipoalérgicas

infantiles, alimentos bajos en calorías y bebidas para deportistas (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Las características de los hidrolizados que se obtengan, estarán determinadas evidentemente por el uso al que estén destinados, así como por el grado de hidrólisis (GH), es decir el número de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original, que va a determinar en gran medida las características restantes del hidrolizado. El GH final está determinado por las condiciones utilizadas es decir, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación y condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el GH es la naturaleza de la actividad de la enzima, es decir su actividad específica y tipo de actividad, de las cuales se hablara más adelante (Vioque & Millán, 2005).

Los hidrolizados que actualmente se producen destinados a la alimentación se pueden clasificar en tres grupos:

- a) **Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (GH<10%)**: En este sentido se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, viscosidad, poder emulsificante, características sensoriales y espumantes (Jayaprakasha & Yoon, 2005; Vioque, Sánchez-Vioque, Clemente, Pedroche & Millán, 2000). Estos ingredientes funcionales con capacidad espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres.
- b) **Hidrolizados con grado de hidrólisis variable**: su principal uso es como saborizantes. En este sentido, los hidrolizados según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, pueden aportar sabor y olor a los alimentos que se añadan. Tradicionalmente los hidrolizados usados como saborizantes se han obtenido mediante hidrólisis ácida (con HCl) por 4-24h/100-125°C, de proteínas vegetales. El sabor del producto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados. Por ejemplo, el ácido glutámico funciona como un potenciador de sabor, la glicina o alanina tienen un sabor dulce. El factor principal es la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros

componentes como azúcares o lípidos (Vioque, Clemente, Pedroche, Yust & Millán, 2001).

- c) **Hidrolizados extensivos** (GH>10%), para su uso en alimentación especializada. Estos hidrolizados están destinados a una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas (Clemente, Vioque, Sánchez-Vioque, Pedroche, Bautista & Millán, 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicaciones de los hidrolizados proteicos extensivos

| | | |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Suplemento proteico | Alimentación 3 ^{ra} edad Nutrición deportiva Dietas de adelgazamiento | |
| Dietas médicas | Hidrolizados hipoalergénicos | |
| | Tratamientos de errores metabólicos congénitos | Fenilcetonuria Tirosinamia |
| | Regeneración de la piel | Quemados Postcirugía |
| | Otras enfermedades | Enfermedad de Crohn |
| | | Fibrosis quística |
| Pancreatitis | | |

Fuente: Vioque y Millán (2005).

Con la hidrólisis extensiva se busca mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen. El desarrollo y diseño de hidrolizados extensivos está siendo objeto de un enorme impulso en los últimos años ya que están ayudando a disminuir enfermedades específicas. Los hidrolizados extensivos, pueden a su vez dividirse en dos grupos, por un lado se encuentran aquellos que son usados como suplemento proteico en la dieta y por el otro hidrolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este último grupo, se alcanza el

máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto (Vioque & Millán, 2005).

Los hidrolizados proteicos con una composición definida también se han propuesto para el tratamiento de enfermedades o situaciones concretas; por ejemplo, en el caso de errores metabólicos congénitos como la fenilcetonuria o tirosinamia, se proponen hidrolizados sin los aminoácidos aromáticos que estos pacientes no pueden metabolizar; así mismo en estados hipermetabólicos como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras es importante un sobreaporte de aminoácidos azufrados que podrían ser proporcionados en forma de hidrolizados enriquecidos en estos aminoácidos (Vioque & Millán, 2005).

3. Péptidos Bioactivos

Dentro de los hidrolizados extensivos, existe una aplicación que por su interés, novedad y potencialidad requiere una mención especial, ya que a través de una hidrólisis dirigida y de procesos de purificación, es posible obtener péptidos bioactivos, los cuales son cadenas de aminoácidos inactivos dentro de la proteína intacta pero que al ser liberados por hidrólisis, ya sea por la digestión en el organismo o por un procesado previo, pueden ser absorbidos por los enterocitos y alcanzar el torrente sanguíneo desempeñando una actividad biológica que pueden tener un efecto fisiológico o funcional más allá de proveer de aminoácidos esenciales y aportar al metabolismo energético, con la posibilidad de exhibir múltiples efectos (Hartmann & Meisel, 2007; Hong, Ming, Yi, Zhanxia, Yongquan & Chi, 2008; Kitts & Weiler, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2003).

Los mecanismos a través de los cuales se produce la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos, se describen en la Tabla 3. Estos péptidos contenidos en hidrolizados, presentan una solubilidad en agua cercana al 100% en un intervalo amplio de pH y tienen la característica de ser hipoalergénicos. Además, su absorción intestinal es mejor que en las proteínas intactas.

Tabla 3. Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos

| Ruta de transporte | Comentarios | Candidatos |
|---------------------------|---|--|
| Ruta paracelular | Difusión a través de las uniones entre células por un proceso de difusión pasiva independiente de energía | Péptidos grandes solubles en agua |
| Difusión pasiva | Difusión a través de un proceso de difusión pasiva transcelular independiente de energía | Péptidos hidrofóbicos |
| Vía transportador | Salida de algunos péptidos del enterocito hacia la circulación porta a través de un transportador de péptidos localizado en la membrana basolateral intestinal. | Péptidos pequeños resistentes a hidrólisis |
| Endocitosis | Unión de las moléculas a la célula para su absorción hacia el interior de la célula vía vesiculización | Péptidos polares grandes |
| Sistema linfático | Absorción de péptidos del espacio intersticial hacia el sistema linfático intestinal | Péptidos altamente lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos por la circulación portal |

Fuente: Sarmadi & Ismail (2010).

4. Fuentes de Péptidos Bioactivos y Aplicaciones

Cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional, puede ser empleada como fuente de péptidos con actividad biológica, llamados también biopéptidos (Karelín, Blishchenko & Ivanov, 1998). De esta forma, se puede establecer la generación de biopéptidos como un nuevo criterio para establecer el valor de una proteína (Meisel, 1998), además de los usualmente empleados como el contenido de aminoácidos esenciales, el valor

biológico, las propiedades de alergenicidad y la presencia de factores no nutritivos (Bush & Hefle, 1996; Fukudome & Yoshikawa, 1992).

Entre las proteínas alimentarias precursoras de biopéptidos destacan las proteínas lácteas, tanto de la caseína como del suero, se han aislado péptidos con actividades antihipertensiva, opioide, antimicrobiana e inmunomoduladora (Darewicz, Dziuba & Minkiewicz, 2007; Dziuba, Niklewicz, Iwaniak, Darewicz & Minkiewicz, 2004; Gobbetti, Stepaniak, De Angelis, Corsetti & Di Cagno, 2002). Las proteínas de la carne de pollo y huevo son importantes fuentes de biopéptidos con actividad antihipertensiva (Pihlanto-Leppälä, Rokka & Korhonen, 1998). El colágeno y la elastina son precursores de péptidos con actividad anticoagulante (Maruyama, Miyoshi, Osa & Tanaka, 1992). Las proteínas vegetales son una alternativa para la obtención de péptidos debido a su mayor disponibilidad y menor costo, como es el caso de la soya, el trigo, el arroz y el maíz (Gibbs, Zougman, Masse & Mulligan, 2004; Yoshikawa, Fujita, Matoba, Takenaka, Yamamoto, Yamauchi et al. 2000). En la Tabla 4 se presentan productos comerciales e ingredientes con función en la salud basada en péptidos bioactivos.

Existe ya en el mercado, una diversidad de productos en los cuales se han incorporado péptidos bioactivos (Tabla 4) utilizados para regular enfermedades cardiovasculares o trombosis, la cual consiste en la obstrucción local del flujo de sangre por una masa en algún vaso arterial o venenoso, ocasionando que los tejidos irrigados por este vaso sufran isquemia. Los trombos que se forman en el tejido vascular, resultan de un desequilibrio en la activación de los procesos homeostáticos normales (Montero-Granados & Monge-Jiménez, 2010). Los fármacos empleados en el tratamiento de la trombosis resultan costosos y en ocasiones presentan efectos secundarios, por lo que se busca generar alternativas terapéuticas que no presenten las limitantes anteriores. La actividad biológica de los péptidos con efecto antitrombótico (aislados de la caseína), parece estar relacionada con su similitud estructural con la cadena α del fibrinógeno humano, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios superficiales, inhibiendo así, la agregación que da lugar a la formación de trombos (Baro, Jiménez,

Martínez & Bouza, 2001). Además de este efecto, los péptidos se han aplicado en problemas de gingivitis, la enfermedad más frecuente en la población adulta, cuando la caries da lugar a pérdidas de uno o varios dientes, estas ausencias, conducirán a problemas masticatorios, digestivos y estéticos (Canseco-Jiménez, 2001). La placa bacteriana formada por la acumulación de bacterias que suelen estar en la boca, prolifera cuando no existe una adecuada higiene bucal, si a esto se suma una dieta rica en azúcares y la existencia de defectos en el esmalte, dará como resultado la desmineralización del esmalte (Ayad, Van Wuyckhuysse, Minaguchi, Raubertas, Bedi, Billings et al., 2000). En relación a esto se demostró que los caseinofosfopéptidos presentes en hidrolizados de leche, presentan actividad anticariogénica debido a la carga negativa de los aminoácidos que los constituyen, principalmente los que tienen unidos grupos fosfatos, de esta forma presentan un sitio para quelar minerales; es así como el efecto anticariogénico se presenta a través de la recalcificación del esmalte dental (Aimutis, 2004). También se han combinado péptidos con fosfato cálcico amorfo para ser empleados como ingredientes de enjuagues bucales, pasta de dientes (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mouse™) o gomas de mascar (Recaldent™, Trident™), debido a su efecto anticariogénico a través de la recalcificación del diente (Reynolds, 1999). Lo anterior pone de manifiesto el potencial que tiene estos péptidos, tanto los que se obtienen directamente por hidrólisis como los que se modifican químicamente, para ser incorporados en diferentes productos.

Tabla 4. Productos comerciales e ingredientes con función en la salud basada en péptidos bioactivos de diversas fuentes

| Marca | Tipo de producto | Péptido bioactivo | Función | Empresa Manufacturera |
|-----------------------------|--|---|--|------------------------------------|
| Calpis | Leche ácida | Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, Derivado de β -caseína y κ -caseína | Reducción de la presión sanguínea | Calpis Co., Japón |
| Evolus | Bebida de leche fermentada enriquecida en calcio | Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, Derivado de β -caseína y κ -caseína | Reducción de la presión sanguínea | Valio Oy, Finlandia |
| BioZate | Hidrolizado del aislado de proteínas del suero | Fragmentos de β -lactoglobulina | Reducción de la presión sanguínea y antitrombótico | Davisco, EUA |
| BioPURE-GMP | Aislado de proteína del suero | κ -casein f (106-169) (Glicomacropéptido) | Prevención de caries dentales, influenciar la coagulación sanguínea, protección contra virus y bacterias | Davisco, EUA |
| PRODIET F200/Lactium | Leche saborizada, confitería, capsulas | as1-casein f (91-100) (Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln- Leu-Leu-Arg) | Reducción de efectos del estrés | Ingredia, Francia |
| Festivo | Queso fermentado bajo en grasa | caseína α_{s1} f (1-9), caseína α_{s1} f (1-7), caseína α_{s1} f (1-6) | Ningún beneficio obtenido aun | MTT Agrifood Research Finlandia |
| Cysteine Peptide | Hidrolizado/ ingrediente | Péptidos derivados de caseína | Productos para incrementar la energía y el sueño | DMV International, Holanda |

| Marca | Tipo de producto | Péptido bioactivo | Función | Empresa Manufacturera |
|----------------------|-----------------------------|---|---|---|
| C12 | Hidrolizado/ ingrediente | Péptidos derivados de caseína | Reducción de la presión sanguínea | DMV International, Holanda |
| Capolac | Ingrediente | Caseinofosfopéptido | Ayuda a la absorción de minerales | Arla Foods Ingredients, Suecia |
| PeptoPro | Ingrediente/ Hidrolizado | Péptidos derivados de caseína | Mejora el desempeño atlético y la recuperación del músculo, | DSM Food Specialties, Holanda |
| Vivinal Alpha | Ingrediente/ Hidrolizado | Péptidos derivados de las proteínas del suero | Productos para la relajación y el sueño | Borculo Domo Ingredients (BDI), Holanda |

Fuente: Korhonen y Pihlanto (2006).

5. Péptidos Antioxidantes

Los péptidos antioxidantes son secuencias peptídicas capaces de participar en la inhibición de reacciones de oxidación en las que están involucradas los radicales libres (RL) o los pro-oxidantes. Dicho efecto puede aprovecharse para prevenir el deterioro de algunas matrices alimentarias durante su procesamiento o almacenamiento en el organismo en condiciones fisiológicas para prevenir o reestablecer las condiciones de estrés oxidativo (Elias, Kellerby & Decker, 2008). La hidrólisis con enzimas se ha utilizado ampliamente en la producción de péptidos antioxidantes a partir de proteínas alimentarias. Las enzimas comerciales alcalasa MR, flavourzima MR y protamex MR derivadas de microorganismos, así como la papaína (fuente vegetal) y pepsina-tripsina (fuente animal) se han empleado también en la producción de péptidos

antioxidantes (Gallegos, Torres, Martínez, Solorza, Alaiz, Girón et al., 2011; Sarmadi & Ismail, 2010). En productos alimentarios, los péptidos antioxidantes también pueden producirse por la acción de microorganismos o enzimas proteolíticas endógenas (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

Las especies reactivas de oxígeno y otros RL producen daño a macromoléculas como el DNA, proteínas y lípidos. La participación de péptidos antioxidantes, al igual que la de otros antioxidantes exógenos (cuando existe un desbalance entre las especies radicales que se producen en el organismo y los sistemas antioxidantes naturales), ha recibido especial atención ya que las especies reactivas de oxígeno y otros RL son causantes de daños implicados en la etiología de enfermedades degenerativas multifactoriales como cáncer, cardiovasculares y desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer, Parkinson, síndrome de Down, entre otras (Niki, 2010).

En general, los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas pueden interactuar con los RL, sobre todo si la energía del radical es alta (por ejemplo radicales hidroxilo) (Elias et al., 2008). Los aminoácidos que han mostrado tener una mayor actividad antioxidante son los aminoácidos nucleófilos que contienen azufre Met y Cys y los aminoácidos aromáticos Trp, Tyr y Phe. Sin embargo, los aminoácidos libres generalmente no son eficaces como antioxidantes en sistemas biológicos y alimenticios, de hecho, se ha reportado que disminuyen la actividad antioxidante (Chan, Decker, Lee & Butterfield, 1994; Rival, Boeriu & Wichers, 2001). La mayor actividad antioxidante de los péptidos en comparación con los aminoácidos libres se atribuye a las propiedades químicas y físicas conferidas por su secuencia de aminoácidos, especialmente la estabilidad de los péptidos resultantes que no inician o propagan más reacciones oxidativas (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Sin embargo, un estudio reciente realizado por Tsopmo, Diehl-Jones, Aluko, Kitts, Elisia y Friel (2009) afirma que el Trp liberado de la leche materna durante la digestión gastrointestinal puede tener potencial para actuar como un potente limpiador de radicales.

La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes de alimentos tienen pesos moleculares que van desde 500 a 1800 Da (Je, Park & Kim, 2005;

Ranathunga, Rajapakse & Kim, 2006), además incluyen aminoácidos hidrófobos tales como Val o Leu en el extremo N-terminal de los péptidos y Pro, His, Tyr, Trp, Met y Cys en sus secuencias (Chen, Muramoto & Yamauchi, 1995, Elias et al., 2008). Por otra parte, residuos de aminoácidos hidrófobos como Val o Leu pueden aumentar la presencia de los péptidos en la interfase agua-lípido y, por tanto, facilitar el acceso a eliminar los RL generados en la fase lipídica (Ranathunga et al., 2006). Diversos mecanismos se han postulado para los péptidos con actividad antioxidante, incluyendo la quelación de metales, eliminación de radicales libres e inhibición de la peroxidación lipídica (Chen, Muramoto, Yamauchi & Nokihara, 1996). Estas propiedades se relacionan con la composición, estructura e hidrofobicidad de los péptidos, así como a la posición que ocupan en la secuencia del péptido, la estructura secundaria, que tiene un papel importante en la capacidad de las secuencias de péptidos para formar un radical estable (Elias et al., 2008). La actividad antioxidante de péptidos e hidrolizados proteicos a partir de fuentes animales y vegetales se presenta en la Tabla 5.

Por otra parte proteínas como la caseína, β -lactoglobulina y lactoferrina han demostrado actuar como antioxidantes en diversos sistemas alimentarios (Díaz & Decker, 2004; Elias, Bridgewater, Vachet, Waraho, McClements & Decker, 2006). En sistemas de emulsión de alimentos, las proteínas y péptidos se pueden localizar en la interfase aceite-agua debido a sus propiedades de superficie activa y pueden formar una barrera física para minimizar el contacto de los lípidos con agentes oxidantes y contribuir a la reducción de la peroxidación lipídica en los sistemas alimentarios (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

Si bien las aplicaciones de los péptidos son distintas, es necesario tomar en cuenta la obtención, purificación y caracterización de estos, para poder determinar la secuencia de aminoácidos que presenten la actividad y de acuerdo a su estructura incorporarlos a sistemas alimenticios o productos para realzar sus actividades funcionales o biológicas.

Tabla 5. Péptidos con actividad antioxidante obtenidos de diferentes fuentes

| Fuente de proteína | Características | Preparación | Actividad |
|-----------------------------|--|--|--|
| Endospermo de arroz | Phe-Arg-Asp-Glu- His- Lys- Lys | Neutrasa | Inhibición de autooxidación , DPPH, Actividad secuestradora de los radicales superóxido e hidroxilo |
| Cacahuete | Peso molecular 3-5 kDa | Esperasa | Poder reductor, Inhibición de la oxidación de LDL humanas, Actividad secuestradora DPPH y quelante de metales |
| Subproducto de algas | Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro- Asn-Arg- Pro-Gln | Pepsina | Actividad secuestradora de radicales hidroxilo, superóxido, peroxilo, DPPH y ABTS, efectos protectores de ADN y prevención de daño celular |
| Piel de rana | Leu-Glu-Glu- Leu- Glu- Glu-Glu-Leu, Glu-Gly-Cys | Alcalasa, neutrasa, pepsina, papaína, α -quimotripsina y tripsina | Inhibición de la peroxidación de lípidos, Actividad secuestrante de los radicales DPPH, Hidróxilo, superóxido |
| Girasol | Hidrolizados de 37% GH, ricos en His y Arg | Pepsina y pancreatina | Actividad quelante de Cu |
| Hojas de alfalfa | Peso Molecular <1000 Da | Alcalasa | Peroxidación de lípidos, Poder reductor, Actividad secuestradora |
| Zeínas de maíz | Con 6.5% de aminoácidos libres y péptidos pequeños (<500 Da) | Pepsina, pancreatina y alcalasa | Actividad quelante y secuestradora |

| Fuente de proteína | Características | Preparación | Actividad |
|-------------------------|--|---|---|
| Gluten de maíz | Fracciones peptídicas de 500 a 1500 Da, con un 41.12% de aminoácidos hidrofóbicos y ~12.7% de aminoácidos aromáticos | Alcalasa | Peroxidación lipídica, poder reductor, actividad secuestradora |
| Cacahuete | No especificada | Alcalasa | Inhibición de la oxidación del ácido linoleico, actividad secuestradora de radicales, poder reductor e inhibición de la oxidación de lípidos del hígado |
| Proteína de soya | Péptidos de peso molecular <10 kDa | Tripsina, papaína, pepsina. Flavourzima | Inhibición de la oxidación del ácido linoleico, Actividad secuestradora de radicales, poder reductor |

Fuente: Korhonen & Pihlanto (2006).

6. Obtención de Péptidos Bioactivos por Hidrólisis Enzimática

Durante las dos últimas décadas, ha habido un creciente interés en el uso de hidrolizados que contengan péptidos bioactivos como agentes para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades crónicas. Como resultado, varias tecnologías basadas principalmente en la hidrólisis enzimática, se han desarrollado para la producción de estos hidrolizados bioactivos (Hernández-Ledesma, Recio, Ramos & Amigo, 2002; Korhonen & Pihlanto, 2006). Esta estrategia es la elección principal, sin embargo, presentan algunas desventajas tales como la necesidad de utilizar procesos químicos o térmicos para detener la reacción de proteólisis, lo que podría

afectar los atributos finales de las proteínas hidrolizadas (Kosseva, Panesar, Kaur & Kennedy, 2009). Por otra parte, el tratamiento puede inducir cambios en la degradación de proteínas y perfiles de péptidos generados dentro de matrices alimentarias complejas como productos lácteos (Kopf-Bolanz, Schwander, Gijs, Vergeres, Portmann & Egger, 2014).

Las enzimas proteolíticas más empleadas en la obtención de hidrolizados *in vitro* son las serinproteasas, que se dividen en dos grupos: las que presentan una actividad catalítica similar a la quimotripsina y las que presentan actividad del tipo subtilisina. Ambas actúan mediante un ataque nucleofílico que incluye la formación de un complejo acil-enzima y su posterior ruptura, liberando los productos de la reacción y la enzima libre. Las proteasas más comunes con aplicación en la industria alimentaria son preparaciones constituidas por mezclas de diferentes enzimas individuales y otros compuestos añadidos para estabilizar la preparación, en la Tabla 6 se presentan las características de proteasas comerciales de diversos orígenes y actividad catalítica (Prieto, Guadix, González-Tello & Guadix, 2007).

Las proteasas tales como alcalasa, flavouzymas, pepsina, pancreatina, quimotripsina, papaína, tripsina y termolisina se han utilizado para producir péptidos bioactivos a partir de proteínas de diversas fuentes (Pedroche, Yust, Girón-Calle, Alaiz, Millán & Vioque, 2002). Las variaciones en el tratamiento como la relación enzima/sustrato, el tratamiento previo de la proteína y la combinación de las enzimas en la hidrólisis juegan un papel importante en la bioactividad de los péptidos generados (Luna-Vital, Mojica, de Mejía, Mendoza & Loarca-Piña, 2014).

Entre las enzimas específicas más utilizadas se encuentran pepsina, tripsina, quimotripsina y renina, las cuales actúan como endopeptidasas y la carboxipeptidasa A, con actividad de exopeptidasa. La Pepsina es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión. Tiene actividad endopeptidasa, hidrolizando preferentemente por el extremo C-terminal de los residuos aromáticos Fen, Tir y Trp. Esta enzima es secretada al estómago como pepsinógeno, que es su precursor inactivo, que se convierte en su forma activa a pH 1.5 y se desactiva preferentemente con un

pH superior a 6. Por otra parte, la pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasas, así como las enzimas amilasa y lipasa pancreática y nucleasas (componentes del fluido pancreático). Tripsina, quimotripsina y elastasa son serinoproteasas, con actividad de endopeptidasas ya que hidrolizan enlaces internos de los péptidos; la hidrólisis con pancreatina resulta en una mezcla de pequeños oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libres (30-40%), que son absorbidos a lo largo del intestino delgado (Sewald & Jakubke, 2002).

Tabla 6. Proteasas comerciales de diversos orígenes empleadas en procesos de hidrólisis in vitro de concentrados y aislados proteínicos de origen vegetal

| Tipo de proteasa | Fuente | Nombre comercial | pH óptimo | Temperatura °C |
|--|---------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|
| Serinoproteasas | <i>Bacillus. licheniformis</i> | Subtilisina Alcalase | 6-10 | 10-80 |
| | <i>Bacillus lentus</i> | Subtilisima Esperasa | 7-12 | 10-80 |
| | Pancreáticas | Tripsina | 7-9 | 10-55 |
| Metaloproteasa | <i>Bacillus amyloliquefacus</i> | Neutrasa | 6-8 | 10-65 |
| Mezcla de aspartatoproteasas, metaloproteasas y carboxipeptidasas | <i>Aspergillus oryzae</i> | Flavourzyme | 4-8 | 10-55 |
| Aspartatoproteasa | Cuajo | Rennet | 3-6 | 10.50 |

Fuente: Prieto et al. (2007).

6.1. Condiciones de Hidrólisis

Debe establecerse una relación proteína/proteasa y definir las principales variables que determinarán el resultado de la reacción de hidrólisis como la temperatura, pH, relación enzima-sustrato y el tiempo de reacción. Los primeros tres factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima (Benitez, Ibarz & Pagan, 2008). Los efectos interactivos entre los parámetros de la hidrólisis también influyen en la composición del hidrolizado; Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. A un pH bajo, todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. Debido a la hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros fenómenos (Caessens, Daamen, Gruppen, Visser & Voragen, 1999).

7. Aislamiento, Purificación y Caracterización de Péptidos Bioactivos

Los procesos de producción a escala piloto de péptidos bioactivos utilizan típicamente membranas de ultrafiltración y cromatografía de líquidos procesando secuencialmente el fraccionamiento y aislamiento de componentes bioactivos a partir de hidrolizados. El diseño de procesos para la separación de péptidos se basa en propiedades moleculares tales como el tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad que dan información cuantitativa acerca de la relación estructura/actividad. Se han establecido nuevas estrategias que incluyan el acoplamiento o integración de procesos complementarios que sean

necesarios para establecer procedimientos eficientes y económicos a nivel industrial, no solo para el fraccionamiento si no para la producción simultánea y continua de péptidos con diferentes propiedades bioactivas (Li-Chan, 2015).

Entre las técnicas empleadas para el aislamiento y purificación de péptidos, destacan las cromatográficas. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es ampliamente utilizada para la separación, identificación y purificación de péptidos bioactivos. Las columnas de fase inversa que se utilizan, permiten una rápida separación y detección de fracciones de péptidos. La cromatografía de fase normal se utiliza preferentemente para la separación de péptidos hidrofílicos. La cromatografía de intercambio iónico permite separar péptidos con base en su carga; mientras que la cromatografía de filtración en gel (en sistemas acuosos) y la cromatografía de permeación en gel (en sistemas no acuosos) permiten la separación con base en el peso molecular (Wang, Mejia & Gonzalez, 2005). Otras técnicas como la ultrafiltración, cristalización, cromatografía de partición y la cromatografía de interacción hidrofóbica a baja presión han sido empleadas para el fraccionamiento y purificación de proteínas (Tabla 7) (Sewald & Jakubke, 2002). Recientemente la ionización por electrospray y espectrometría de masas, están siendo consideradas como una herramienta importante para la identificación y caracterización de proteínas (Singh, Vij & Hati, 2014b).

La identificación de péptidos con actividad biológica en alimentos, presenta una serie de dificultades que limitan el conocimiento acerca de su liberación a partir de las proteínas de origen; estas dificultades se deben a la complejidad de la matriz precursora y a las bajas concentraciones que se encuentran los analitos, por eso es necesario llevar a cabo etapas de purificación y concentración. La ultrafiltración (UF) es una técnica que ha sido empleada con éxito para la obtención de fracciones ricas en péptidos con actividad antihipertensiva procedentes de proteínas lácteas (Gómez-Ruiz, Taborda, Amigo, Recio & Ramos, 2006; Hernández-Ledesma, Amigo, Ramos & Recio, 2004).

Tabla 7. Técnicas usadas para el aislamiento e identificación de péptidos bioactivos

| Técnicas | Aplicación | Péptidos bioactivos identificados | Referencia |
|--|---|---|--|
| Cromatografía de exclusión molecular | Usada para fraccionamiento de proteínas | <ul style="list-style-type: none"> • Péptidos antioxidantes de hidrolizados de Sardinelle | Bougatef , Nedjar-Arroume, Manni, Ravallec, Barkia, Guillochon, et al., 2010 |
| Cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa | Separación de péptidos a partir de hidrolizados de proteínas | <ul style="list-style-type: none"> • Péptidos inhibidores de la ECA, antioxidantes y antimicrobianos de queso cheddar • Péptido inhibidor de la adipogenesis (Ile-Gln-Asn) de hidrolizados proteicos de soya • Péptido anticáncer lunasina | Kim, Bae, Ahn, Lee y Lee, 2007; Pritchard, Phillips y Kailasapathy, 2010; Rho, Lee, Chung, Kim y Lee, 2009 |
| Cromatografía líquida-Espectrometría de masas | Separación física de los péptidos y análisis de masas | <ul style="list-style-type: none"> • Péptido hipocolesterolémico de la soya (Trp-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu) • Identificación de cinco tripéptidos inhibidores de la ECA (Phe-Ile-Val) , (Leu-Leu-Pro), (Leu-Asp-Phe) derivados de la soya • Péptidos inhibidores de la sintasa de ácidos grasos de la β conglucina de la soya | Gu y Wu, 2013; Martinez-Villaluenga, Rupasinghe, Schuler y Gonzalez de Mejia, 2010; Zhong, Zhang, Ma y Shoemaker, 2007 |
| Ionización por electrospray-Espectroscopia de masas | Determinación de pesos moleculares y secuencia de aminoácidos de los péptidos purificados | <ul style="list-style-type: none"> • Péptidos antioxidantes Leu-His-Tyr-Leu-Ala-Arg-Leu, Gly-Gly-Glu, Gly-Ala-His, Gly-Ala-Trp-Ala, Pro-Tyr-Leu y Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-His) de sardinelle • Péptidos antioxidantes (Ala-Asp-Ala-Phe) de hidrolizados de nuez | Bougatef et al., 2010; Chen, Yang, Sun, Niu y Liu, 2012 |

Fuente: Singh, Vij y Hati (2014a).

El diseño de una metodología eficaz de fraccionamiento de péptidos es de vital importancia para la separación de péptidos y aún más, cuando el proceso debe aplicarse a escala industrial. Las tecnologías de separación que discriminan diferencias en la carga, tamaño e hidrofobicidad, se pueden emplear para fraccionar los hidrolizados de proteínas y obtener fracciones de péptidos con una mayor funcionalidad o mayor valor nutritivo en una forma más purificada; las técnicas de separación de membrana parecen ser adecuados para este propósito, basándose en la permeabilidad selectiva de uno o más componentes líquidos a través de la membrana de acuerdo con las fuerzas de conducción (Muro, Riera & Fernández, 2013).

Los procesos de membrana son vistos como herramientas eficientes para el desarrollo de productos con valor añadido como los péptidos bioactivos (Pouliot, 2008). Estos procesos de separación se basan en la permeabilidad selectiva de uno o más líquidos a través de una membrana de acuerdo con la diferencia de presión. Las técnicas de membrana impulsadas por presión se pueden observar en la Figura 1, la UF y nanofiltración se han aprobado para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas debido al hecho de que el peso molecular de la mayoría de los péptidos bioactivos se encuentra dentro del rango normal del tamaño de poro de estas membranas.

La UF se aplica comúnmente para preparar soluciones enriquecidas de péptidos a partir de hidrolizados de proteínas para mejorar la bioactividad de los péptidos; se utiliza para separar péptidos con un tamaño inferior a 7 kDa (Mehra & Kelly, 2004). Sin embargo, la combinación de procesos de UF y nanofiltración permite obtener polipéptidos <1 kDa, ya que primero se somete el hidrolizado a UF con el fin de obtener el rechazo completo de las proteínas intactas y péptidos intermedios. Las fracciones resultantes se someten a un fraccionamiento por nanofiltración obteniendo péptidos <1 kDa, ajustando a diferentes pH's de la membrana y obtener una mejor separación (Butylina, Luque & Nyström, 2006; Farvin, Baron, Nielsen, Otte & Jacobsen, 2010).

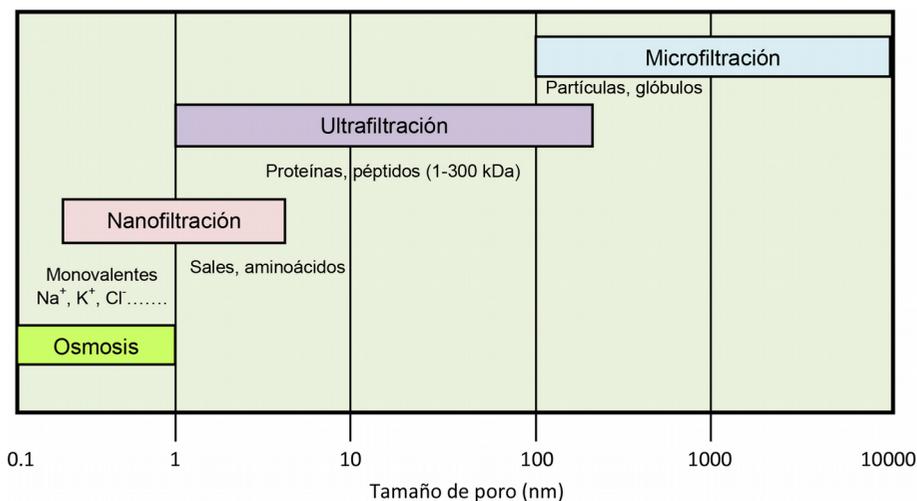


Figura 1. Procesos de membrana impulsados por presión (Muro et al., 2013)

En estudios recientes también se ha aplicado el uso de UF y HPLC en hidrolizados de leche para mejorar la separación de péptidos; demostrando que la UF es suficiente para concentrar péptidos y posteriormente el permeado y retenido se trataron por exclusión molecular- HPLC para obtener péptidos pequeños con actividad biológica (Kapel, Klingenberg, Framboisier, Dhulster & Marc, 2011).

Actualmente una de las nuevas tecnologías empleadas a nivel industrial para producir y separar péptidos es el reactor de membrana enzimática (RME) que separa secuencias de péptidos específicos por medio de una membrana selectiva, que se utiliza para separar el biocatalizador de los productos de reacción y el fraccionamiento de péptidos (Pouliot, Gauthier, Groleau, Mine & Shahidi, 2006). Esta tecnología de separación de péptidos está ganando interés, porque es un modo específico para la ejecución de procesos en lote o continuos, en los que las enzimas son separadas de los productos finales con la ayuda de una membrana selectiva, de esta manera, es posible obtener la retención completa de la enzima sin problemas típicos de desactivación de la enzima. Hoy en día, esta técnica, opera bajo un campo eléctrico para la recolección continua de algunos péptidos biológicamente

activos, tales como fosfopéptidos y precursores de casomorfinas de la digestión triptica de caseína (Righetti, Nembri, Bossi & Mortarino, 1997).

Tabla 8. Péptidos bioactivos obtenidos por membranas de UF

| Fuente de hidrolizado proteico | Actividad biológica | Referencia |
|---------------------------------------|----------------------------|---|
| Proteína de pescado | Inhibidor de la ECA | Fujita, Yamagami y Ohshima, 2001 |
| Proteína de alfalfa | Antioxidante | Xie, Huang, Xu y Jin, 2008 |
| Gluten de trigo | Inhibidor de la ECA | Kong, Zhou y Hua, 2008 |
| Proteína de soya | Inhibidor de la ECA | Wu y Ding, 2002 |
| Papa | Antimicrobiano | Kim, Park, Kim, Lim, Park y Hahm, 2005 |
| Papa | Antimicrobiano | Kim, Park, Kim, Lee, Lim, Cheong et al., 2006 |

Fuente: Muro et al. (2013).

En los últimos años, el uso de RME se ha convertido en un área de investigación interesante debido a su bajo costo de producción y la seguridad del producto (Sharma & Sharma, 2009). La Tabla 8 resume algunos ejemplos de procesos para la separación o concentración de péptidos bioactivos por medio de membranas de UF y RME, sin embargo, el uso de la UF limita la selectividad de fraccionar péptidos pequeños, por lo que el uso de RME equipado con membranas de UF si logra el fraccionamiento del péptido, pero para obtenerlo de una forma más purificada deben utilizarse membranas de nanofiltración como un paso adicional.

8. Perspectivas

Actualmente muchos productos comerciales no están disponibles a la población, lo cual se atribuye a una variedad de razones como: la escasez de los ensayos clínicos o toxicológicos (para confirmar la bioactividad, eficacia y seguridad), alto costo de producción, problemas en la preparación, reproducibilidad del producto, amargor, color y otros problemas organolépticos (Samaranayaka & Li-Chan, 2011), Por lo que es importante estudiar las propiedades tecno-funcionales de las fracciones peptídicas, su biodisponibilidad al incorporarlos a distintas matrices alimentarias.

Si bien se han identificado diversos péptidos con actividad biológica y funcional, es sumamente complejo purificarlos y obtener las secuencias de aminoácidos que determinen cierta actividad, por lo que es necesario elegir de manera apropiada la fuente y obtener de manera adecuada los péptidos bioactivos que después de purificarlos y caracterizarlos de manera *in vitro* lleguen a ejercer la misma actividad en un sistema *in vivo*. Asimismo, es necesario profundizar aún más sobre las diversas técnicas para su purificación y aplicación a nivel industrial.

Referencias

- Aimutis, W.R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *The Journal of Nutrition*, 134, 989S-995S.
- Araya, H., & Lutz, M. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *Revista chilena de nutrición*, 30, 8-14.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000100001>
- Ayad, M., Van Wuyckhuysse, B., Minaguchi, K., Raubertas, R., Bedi, G., Billings, R. et al. (2000). The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *Journal of Dental Research*, 79, 976-982.
<http://dx.doi.org/10.1177/00220345000790041401>
- Baro, L., Jiménez, B., Martínez, A., & Bouza, J. (2001). Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharm*, 42, 135-145.
- Benitez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42, 227-236.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. et al. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food chemistry*, 118, 559-565.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>

Bush, R.K., & Hefle, S.L. (1996). *Food allergens*. Taylor & Francis. 119-163.

<http://dx.doi.org/10.1080/10408399609527762>

Butylina, S., Luque, S., & Nyström, M. (2006). Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 280, 418-426.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2006.01.046>

Caessens, P.W., Daamen, W.F., Gruppen, H., Visser, S., & Voragen, A.G. (1999). β -Lactoglobulin hydrolysis. 2. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 2980-2990.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf981230o>

Canseco-Jiménez, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 58, 673-676.

Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 67, 269-274.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00130-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00130-2)

Cortés, M., Chiralt, A., & Puente, L. (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*, 12, 5-14.

Chan, W.K., Decker, E.A., Lee, J.B., & Butterfield, D.A. (1994). EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42, 1407-1410.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf00043a003>

Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2619-2623.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf950833m>

Chen, H.-M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean. beta.-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf00051a004>

Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38, 344-349.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.017>

- Darewicz, M., Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (2007). Computational characterisation and identification of peptides for in silico detection of potentially celiac-toxic proteins. *Food science and technology international*, 13, 125-133.
<http://dx.doi.org/10.1177/1082013207077954>
- Díaz, M., & Decker, E.A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8208-8213.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf048869e>
- Dziuba, J., Niklewicz, M., Iwaniak, A., Darewicz, M., & Minkiewicz, P. (2004). Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins. *Acta Alimentaria*, 33(3), 227-235.
<http://dx.doi.org/10.1556/AAlim.33.2004.3.3>
- Elias, R.J., Bridgewater, J.D., Vachet, R.W., Waraho, T., McClements, D.J., & Decker, E.A. (2006). Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 9565-9572.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf062178w>
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., & Decker, E.A. (2008a). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48, 430-441.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Farvin, K.S., Baron, C.P., Nielsen, N.S., Otte, J., & Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2—Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123, 1090-1097.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.029>
- Fujita, H., Yamagami, T., & Ohshima, K. (2001). Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition research*, 21, 1149-1158.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00333-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00333-5)
- Fukudome, S.-I., & Yoshikawa, M. (1992). *Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization*. Elsevier. 107-111.
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80414-c](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80414-c)
- Gallegos, S., Torres, C., Martínez, A.L., Solorza, J., Alaiz, M., Girón, J. et al. (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1618-1624.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4357>
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food research international*, 37, 123-131.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.010>

- Gimeno-Creus, E. (2003). Alimentos funcionales: ¿alimentos del futuro? *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 22, 68-71.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). *Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing*. Taylor & Francis. 223-239.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Gómez-Ruiz, J.Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., & Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223, 595-601.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0238-0>
- Gu, Y., & Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food chemistry*, 141, 2682-2690.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.064>
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 1504-1510.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf034997b>
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., & Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12, 805-812.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00080-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00080-8)
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062-1071.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.005>
- Jayaprakasha, H., & Yoon, Y. (2005). Characterization of physicochemical and functional behavior of enzymatically modified spray dried whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 60, 305-309.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38, 45-50.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>

- Kapel, R., Klingenberg, F., Framboisier, X., Dhulster, P., & Marc, I. (2011). An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *Journal of Membrane Science*, 383, 26-34.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2011.08.025>
- Karelín, A.A., Blishchenko, E.Y., & Ivanov, V.T. (1998). A novel system of peptidergic regulation. *FEBS letters*, 428, 7-12.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00486-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00486-4)
- Kim, H.J., Bae, I.Y., Ahn, C.-W., Lee, S., & Lee, H.G. (2007). Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *Peptides*, 28, 2098-2103.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.030>
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Kim, M.-H., Lim, H.-T., Park, Y., & Hahm, K.-S. (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and biophysical research communications*, 330, 921-927.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.057>
- Kim, M.-H., Park, S.-C., Kim, J.-Y., Lee, S.Y., Lim, H.-T., Cheong, H. et al. (2006). Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety “Golden Valley”. *Biochemical and biophysical research communications*, 346, 681-686.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.186>
- Kitts, D.D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, 9, 1309-1323.
<http://dx.doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Kong, X., Zhou, H., & Hua, Y. (2008). Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 920-926.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3172>
- Kopf-Bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergeres, G., Portmann, R., & Egger, L. (2014). Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal*, 35, 130-138.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.012>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Bioactive peptides: New challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 129-134.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

- Kosseva, M.R., Panesar, P.S., Kaur, G., & Kennedy, J.F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 437-447.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005>
- Li-Chan, E.C.Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Luna-Vital, D.A., Mojica, L., de Mejía, E.G., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*.
- Martinez-Villaluenga, C., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. *FEBS journal*, 277, 1481-1493.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07577.x>
- Maruyama, S., Miyoshi, S., Osa, T., & Tanaka, H. (1992). Prolyl endopeptidase inhibitory activity of peptides in the repeated sequence of various proline-rich proteins. *Journal of fermentation and bioengineering*, 74, 145-148.
[http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90073-4](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(92)90073-4)
- Mehra, R., & Kelly, P. (2004). Whey protein fractionation using cascade membrane filtration. *Bulletin-International Dairy Federation*, 40-44.
- Meisel, H. (1998). *Overview on milk protein-derived peptides*. Elsevier. 363-373.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0958-6946\(98\)00059-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-6946(98)00059-4)
- Montero-Granados, C., & Monge-Jiménez, T. (2010). Patología de la Trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 68(591), 73-75.
- Muro, C., Riera, F., & Fernández, A. (2013). Advancements in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, 241.
<http://dx.doi.org/10.5772/53674>
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
- Palou, A., & Serra, F. (2000). Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación, nutrición y salud*, 7, 76-90.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 960-965.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1126>

- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325-331.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00048-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00048-X)
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology—From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18, 735-740.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.005>
- Pouliot, Y., Gauthier, S., Groleau, P., Mine, Y., & Shahidi, F. (2006). Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, 639-658.
- Prieto, C.A., Guadix, A., González-Tello, P., & Guadix, E. M. (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *Journal of food engineering*, 78, 257-265.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.024>
- Pritchard, S.R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43, 1545-1548.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., & Kim, S.-K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (Conger myriaster). *European Food Research and Technology*, 222, 310-315.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0079-x>
- Reynolds, E.C. (1999). Anticariogenic casein phosphopeptides. *Protein and Peptide Letters*, 6, 295-304.
- Rho, S.J., Lee, J.-S., Chung, Y.I., Kim, Y.-W., & Lee, H.G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44, 490-493.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.017>
- Righetti, P.G., Nembri, F., Bossi, A., & Mortarino, M. (1997). Continuous Enzymatic Hydrolysis of β -Casein and Isoelectric Collection of Some of the Biologically Active Peptides in an Electric Field. *Biotechnology progress*, 13, 258-264.
<http://dx.doi.org/10.1021/bp970019e>
- Rival, S.G., Boeriu, C.G., & Wichers, H.J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 295-302.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0003911>
- Samaranayaka, A.G. & Li-Chan, E.C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3, 229-254.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>

- Sarmadi, B.H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Serra, L., & Aranceta, J. (2005). *Alimentos funcionales para una alimentación más saludable*. SENC.
- Sewald, N., & Jakubke, H.-D. (2002). *Peptides: chemistry and biology*. Wiley-VCH.
<http://dx.doi.org/10.1002/352760068x>
- Sharma, A.K., & Sharma, M.K. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology advances*, 27, 811-832.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.004>
- Singh, B.P., Vij, S., & Hati, S. (2014a). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Singh, B.P., Vij, S., & Hati, S. (2014b). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Tsopmo, A., Diehl-Jones, B.W., Aluko, R.E., Kitts, D.D., Elisia, I., & Friel, J.K. (2009). Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatric research*, 66, 614-618.
<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181be9e7e>
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.d.M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132-136.
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos Alimenticios de gran calidad Funcional y Nutricional. *CTC Alimentación*, 26.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 447-450.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11746-000-0072-y>
- Wang, W., Mejia, D., & Gonzalez, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4, 63-78.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x>
- Wu, J., & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35, 367-375.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00131-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00131-4)
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111, 370-376.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.078>

Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R. et al. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors*, 12, 143-146.

<http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520120122>

Zhong, F., Zhang, X., Ma, J., & Shoemaker, C. F. (2007). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food research international*, 40, 756-762.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.005>