



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EFECTO DE LA COCCIÓN Y LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL IN VITRO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN HIDROLIZADO DE SUBPRODUCTOS DE TOMATE

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: MILAGROS ARNAL SALINAS

TUTOR/A ACADEMICO: PAU TALENS OLIAG
COTUTOR/A: LETICIA MORA SOLER
MARTA GALLEGO IBAÑEZ

Curso Académico: 2019-2020

VALENCIA, febrero 2020

EFFECTO DE LA COCCIÓN Y LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO* SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN HIDROLIZADO DE SUBPRODUCTOS DE TOMATE

Milagros Arnal Salinas¹, Pau Talens Oliag¹, Marta Gallego Ibáñez², Leticia Mora Soler².

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la estabilidad a la cocción y a la digestión gastrointestinal *in vitro* de la actividad antioxidante de un hidrolizado de subproductos de tomate (semillas y piel), así como identificar mediante espectrometría de masas los péptidos presentes en este y realizar un análisis *in silico* de su potencial bioactividad. Para ello, se preparó un hidrolizado de subproductos de tomate con la enzima Alcalasa y se cocció a 70 °C a distintas concentraciones (1, 5 y 10 mg/mL) y tiempos (5, 10 y 15 minutos). Tras la cocción, se sometió a una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* para evaluar la estabilidad de la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad antioxidante del hidrolizado no cambiaba significativamente con la cocción, aunque sí se veía afectada tras la simulación de la digestión gastrointestinal. Por otro lado, el hidrolizado de subproductos de tomate fue fraccionado y purificado, mediante cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, y las fracciones con mayor actividad antioxidante se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem. Se identificaron un total de 152 péptidos, a los cuales se les realizó un análisis *in silico* mediante herramientas bioinformáticas para evaluar su potencial como bioactivos.

PALABRAS CLAVE: péptidos antioxidantes, cocción, digestión gastrointestinal *in vitro*, espectrometría de masas, análisis *in silico*.

RESUM

Aquest treball té com a objectiu avaluar l'estabilitat a la cocció i a la digestió gastrointestinal simulada *in vitro* de l'activitat antioxidant de un hidrolitzat de subproductes de tomaca (llavors i pell) , així com també identificar mitjançant espectrometria de masses els pèptids presents en aquest i realitzar un anàlisis

¹ Dpto. Tecnología de Alimentos. Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España.

in silico de la seua potencial bioactivitat. Per a fer-ho, es va preparar un hidrolitzat de subproductes de tomaca amb l'enzim Alcalasa i es va coure a 70 °C a diferents concentracions (1, 5 i 10 mg/mL) i temps (5, 10 i 15 minuts). Després de la cocció, l'hidrolitzat es va sotmetre a una digestió gastrointestinal simulada *in vitro* per a avaluar l'estabilitat de l'activitat antioxidant. Els resultats obtinguts mostraren que l'activitat antioxidant del hidrolitzat no canviava significativament amb la cocció, encara que sí que es veia afectada després de la simulació de la digestió gastrointestinal. D'altra banda, l'hidrolitzat de subproductes de tomaca va ser fraccionat i purificat, mitjançant cromatografia d'exclusió molecular i cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa, i les fraccions amb major activitat antioxidant es van analitzar mitjançant espectrometria de masses en tàndem. Es van identificar un total de 152 pèptids, als quals se'ls va realitzar un anàlisi *in silico* mitjançant eines bioinformàtiques per a avaluar el seu potencial com a bioactius.

PARAULES CLAU: pèptids antioxidants, cocció, digestió gastrointestinal *in vitro*, espectrometria de masses, anàlisi *in silico*.

ABSTRACT

This work aims to evaluate the stability to cooking and to *in vitro* gastrointestinal digestion of the antioxidant activity of a tomato by-products hydrolysate (seeds and skin), in order to identify the present peptides by mass spectrometry and to perform an *in silico* analysis of their potential bioactivity. For this, an hydrolysate of tomato by-products with the enzyme Alcalase was prepared and cooked at 70 °C at different concentrations (1, 5 and 10 mg/mL) and times (5, 10 and 15 minutes). After cooking, the hydrolysate was subjected to simulated *in vitro* gastrointestinal digestion to assess the stability of the antioxidant activity. The obtained results showed that the antioxidant activity of the hydrolysate did not change significantly after cooking, although it was affected after the simulation of gastrointestinal digestion. On the other hand, the tomato by-products hydrolysate was fractionated and purified, by size-exclusion chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography, and the fractions with the highest antioxidant activity were analysed by tandem mass spectrometry. A total of 152 peptides were identified, which were performed *in silico* analysis using bioinformatics tools to assess their potential as bioactives.

KEY WORDS: antioxidant peptides, cooking, *in vitro* gastrointestinal digestion, mass spectrometry, *in silico* analysis.

1. INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos son fragmentos proteicos que suelen tener entre 2 y 20 aminoácidos, y pueden ejercer su función una vez son liberados de su proteína de origen tras un proceso de hidrólisis enzimática (Hajfathalian et al., 2018; Moayedi et al., 2018). Este proceso puede llevarse a cabo de forma natural durante la digestión gastrointestinal, producirse durante el procesado de los alimentos, como el curado o la fermentación, o puede ser inducido mediante la utilización de enzimas comerciales o microorganismos en condiciones controladas (Mechmeche et al., 2017; Toldrá et al., 2018). Los péptidos obtenidos, dependiendo del tamaño, y la composición y secuencia de los aminoácidos, pueden ejercer diferentes actividades fisiológicas como por ejemplo actividad antioxidante, antihipertensiva o antimicrobiana, entre otras (Mechmeche et al., 2017; Moayedi et al., 2018).

La actividad antioxidante es una de las bioactividades más estudiadas ya que los compuestos con esta actividad podrían mejorar la calidad de los productos previniendo o retrasando la oxidación lipídica y proteica y, además, podrían influir positivamente en la salud ya que son capaces de regular el estrés oxidativo de las células (Gallego et al., 2018).

Los péptidos con actividad antioxidante ejercen esa función gracias a su capacidad para eliminar radicales libres, donar electrones y/o quelar metales, la cual viene determinada por su composición en aminoácidos y por su estructura (Meshginfar et al., 2018; Hajfathalian et al., 2018). Estos péptidos pueden ser obtenidos de fuentes vegetales como algas, maíz o semillas de cáñamo, o de fuentes animales como el jamón curado, el queso o la leche. Sin embargo, en los últimos años es tendencia utilizar subproductos de la industria agroalimentaria ya que muchos de ellos son ricos en proteínas y es una forma de reducir el impacto ambiental que estas industrias generan. En este sentido, la industria del tomate genera una importante cantidad de subproductos, que representa entre un 7 y 7,5% de los desechos sólidos. Estos están compuestos principalmente por pieles y semillas, las cuales representan alrededor del 44% de los desechos y tienen un 28% en peso de proteína, lo que las convierte en una buena y posible fuente de péptidos bioactivos (Moayedi et al., 2017; Moayedi et al., 2018).

La principal forma de generación de péptidos bioactivos a partir de subproductos alimentarios es mediante la hidrólisis controlada con enzimas comerciales. Una vez optimizada la hidrólisis, la actividad antioxidante se determina mediante ensayos *in vitro*. Sin embargo, la actividad biológica *in vitro* no siempre se corresponde con la actividad *in vivo*, por ello es importante considerar la bioaccesibilidad de los péptidos tras la ingestión mediante estudios de digestión gastrointestinal *in vitro* (Meshginfar et al., 2018).

La identificación de los péptidos generados tras la hidrólisis se realiza mediante espectrometría de masas, concretamente mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. La función de las técnicas cromatográficas es purificar todo lo posible la muestra para poder obtener unos buenos espectros de masas que permitan la identificación de los péptidos y de sus proteínas de origen. Para ello, se utilizan motores de búsqueda

como Mascot o Paragon y bases de datos de proteínas disponibles en línea como UniProt o NCBI (Hajfathalian et al., 2018).

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la estabilidad a la cocción y a la digestión gastrointestinal *in vitro* de la actividad antioxidante de un hidrolizado de subproductos de tomate, así como la identificación mediante espectrometría de masas en tándem de los péptidos generados. Además, las secuencias obtenidas fueron analizadas *in silico* con herramientas bioinformáticas para evaluar su potencial como bioactivos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y reactivos

Para la obtención de los subproductos de tomate se utilizaron tomates de una variedad de tipo larga vida.

La enzima utilizada para la hidrólisis de los subproductos de tomate fue la Alcalasa[®] 2.4L, proteasa procedente de *Bacillus licheniformis* con actividad ≥ 2.4 U/g (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.). Las enzimas utilizadas para la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* fueron: α -amilasa salival, pepsina porcina, α -amilasa pancreática porcina, lipasa pancreática porcina, extracto de bilis porcino (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.); tripsina y quimotripsina (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza).

Los reactivos utilizados en los ensayos de actividad antioxidante fueron: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferrocianuro de potasio (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.); ácido tricloroacético (TCA), cloruro férrico (FeCl_3) (Scharlau, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España); y hidroxitolueno butilado (BHT) (Merck-Schuchardt, Dr. Th. Schuchardt & Co., Hohenbrunn, Germany). Además, también se utilizó: Tris base (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.); bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), ácido clorhídrico 37% (HCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de calcio (CaCl_2) (Panreac, Panreac Química S.A., Castellar del Valles, España); y etanol absoluto (Scharlau, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España).

2.2. Obtención y liofilización de los subproductos de tomate

Para obtener los subproductos de tomate, piel y semillas, se escaldaron los tomates en un baño a 80 °C durante un minuto, y se separaron de la pulpa, la piel y las semillas. Después, se liofilizaron en un liofilizador (VirTis Wizard 2.0, SP Scientific, Harbour Group, St. Louis, Missouri) a -85 °C de temperatura y 0.0199 milibares de presión, durante aproximadamente 48 h. Una vez liofilizados, se trituraron en una picadora (Moulinette 1.2.3, Moulinex, Groupe SEB Ibérica, Barcelona, España) hasta obtener un polvo fino.

2.3. Hidrólisis enzimática del liofilizado de subproductos de tomate

Con el objetivo de incrementar la actividad antioxidante de los subproductos de tomate, se realizó una hidrólisis controlada con la enzima Alcalasa, a una temperatura de 50 °C, pH 8 y durante un tiempo de 30 minutos (Arnal, 2018).

Se tomaron 0,3 g de polvo de subproducto de tomate y se le añadieron 10 mL de tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8. Tras poner la solución en el digestor y una vez estabilizada la temperatura a 50 °C, se añadieron 100 µL de la enzima y se mantuvo la hidrólisis durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, la enzima se inactivó en un baño a 90 °C durante 2 minutos. Tras esto, las proteínas se precipitaron añadiendo 3 volúmenes de etanol y manteniéndolo durante 20 horas a 4 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10000 rpm y 4 °C durante 20 minutos (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), se rotaevaporó para eliminar el etanol (Hei-VAP Value, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany), se liofilizó y se mantuvo a -20°C hasta su posterior análisis.

2.4. Análisis *in vitro* de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada por triplicado utilizando dos métodos: el método de captación del 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) y el método del poder reductor del hierro (FeRP). Como control negativo se utilizó agua bidestilada y como positivo se utilizó BHT.

2.4.1. MÉTODO DE CAPTACIÓN DE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

El método utilizado fue el descrito por Bersuder, Hole y Smith (1998) con algunas modificaciones. A 100 µL de muestra se le añadieron 500 µL de etanol absoluto, 125 µL de solución DPPH al 2% en etanol, y se homogenizó con el vórtex. Añadidos los reactivos, se incubó durante 60 minutos en oscuridad. Los radicales reducidos se midieron en un espectrofotómetro a 517 nm. Una menor absorbancia de la mezcla de reacción indica una mayor actividad de captación de radicales libres.

El porcentaje de captación del DPPH fue calculado según la ecuación 1 y cuanto mayor es el porcentaje, mayor es la actividad antioxidante:

$$\% \text{ de captación del DPPH} = \left(1 - \frac{A_M}{A_C}\right) \times 100 \quad (1)$$

Donde: A_M = absorbancia muestra; A_C = absorbancia control negativo.

2.4.2. MÉTODO DEL PODER REDUCTOR DEL HIERRO (FeRP)

La medida del poder reductor de las muestras se llevó a cabo según el método descrito por Tsai, Huang y Mau (2006) con algunas modificaciones. A 70 µL de muestra se le añadieron 70 µL de tampón fosfato 200 mM a pH 6,6 y 70 µL de ferrocianuro de potasio a una concentración de 10 mg/mL. Tras mezclar bien, se incubaron en estufa a 50 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo,

se añadieron 70 μL de TCA (100 mg/mL) a cada muestra y se centrifugaron a 4000 rpm y 4 °C durante 10 minutos (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Una vez finalizada la centrifugación, se tomaron 140 μL del sobrenadante y se le añadieron 140 μL de agua bidestilada, 28 μL de cloruro férrico a una concentración de 1 mg/mL y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 690 nm. Cuanto mayor sea la absorbancia de la muestra, mayor será la actividad antioxidante de esta.

2.5. Estudio de la estabilidad a la cocción de la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate

Para estudiar la estabilidad a la cocción, el hidrolizado disuelto con agua bidestilada a 1, 5 y 10 mg/mL fue sometido a una cocción suave (70 °C) durante distintos tiempos: 5, 10 y 15 minutos. Posteriormente, se midió la actividad antioxidante *in vitro* con los métodos DPPH y FeRP.

2.6. Estudio de la estabilidad a la digestión gastrointestinal *in vitro* de la actividad antioxidante del hidrolizado cocido de subproductos de tomate

Para estudiar la estabilidad a la digestión gastrointestinal *in vitro* de la actividad antioxidante del hidrolizado cocido de subproductos de tomate, se realizó una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* según la metodología descrita por Minekus et al. (2014) con pequeñas modificaciones.

Para simular la fase gástrica, a 2 mL de hidrolizado de subproductos de tomate cocido a una concentración de 100 mg/mL, se le añadió HCl 1 M hasta alcanzar un pH de 3. Una vez alcanzado este, se añadió pepsina porcina para lograr en la mezcla final una actividad de 2000 U/mL y CaCl_2 para alcanzar en la mezcla final 50 mM. A continuación, se dejó durante 2 h a 37 °C con agitación constante. Transcurrido el tiempo, la enzima fue inactivada ajustando el pH a 7 con NaOH 1 M. Para simular la fase intestinal, se añadieron las enzimas digestivas con el objetivo de lograr en la mezcla final las siguientes actividades: 100 U/mL de tripsina, 25 U/mL de quimiotripsina, 200 U/mL de α -amilasa pancreática porcina, 2000 U/mL de lipasa pancreática porcina y 10 mM de extracto de bilis porcino. Además, también se le añadió CaCl_2 hasta alcanzar 50 mM en la mezcla final. Tras 2 horas a 37 °C con agitación constante, se finalizó la digestión mediante la inactivación de las enzimas en un baño a 95 °C durante 2 minutos. Tras esto, se precipitaron las proteínas con 3 volúmenes de etanol y manteniendo las muestras a 4 °C durante 20 horas. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 12000 g, 4 °C y durante 10 minutos (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Finalmente, se eliminó el etanol con un rotavapor (Hei-VAP Value, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany), se liofilizó y disolvió con agua bidestilada a una concentración de 100 mg/mL para posteriormente realizar los análisis de actividad antioxidante con los métodos DPPH y FeRP a una concentración de 1, 5 y 10 mg/mL.

2.7. Fraccionamiento y purificación del hidrolizado de subproductos de tomate mediante cromatografía de exclusión molecular

Con el objetivo de fraccionar y purificar la muestra, 5 mL de una disolución de hidrolizado de subproductos de tomate a una concentración de 25 mg/mL y filtrada con filtro de jeringa de 0,45 μ m se introdujeron en una columna Sephadex G-25 (2,5 cm x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Como fase móvil se utilizó HCl 0,01 N con un flujo de 0,25 mL/min. En total se recolectaron 141 fracciones de 5 mL con un colector automático.

Con el objetivo de determinar el perfil peptídico de la muestra se determinó la absorbancia de cada una de las fracciones a 214, 254 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Agilent 8453, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

A continuación, todas aquellas fracciones que absorbieron a las longitudes de onda mencionadas se agruparon en grupos de 3 con un volumen de elución final de 15 mL y se liofilizaron con el fin de concentrar las muestras para el posterior análisis de actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y FeRP. Las fracciones con mayor actividad antioxidante se liofilizaron de nuevo y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.8. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Las fracciones con mayor actividad antioxidante obtenidas tras la cromatografía de exclusión molecular se fraccionaron según su hidrofobicidad mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent 1100 HPLC system, Agilent Technologies, CA, USA) con una columna Symmetry C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 280 μ L de agua bidestilada, se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y 100 μ L se inyectaron en la columna. Las fases móviles utilizadas fueron 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) en agua como fase A y 0,085 % de TFA en 60:40 (v/v) acetonitrilo:agua como fase B. Los péptidos se eluyeron con 100 % de fase A durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 0 a 5 % de fase B durante 8 minutos, de 5 a 80% de fase B durante 5 minutos, de 80 a 100% durante 10 minutos, de 100 a 50% de fase B durante 3 minutos y de 50 a 0% de fase B durante 2 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min y midiendo la absorbancia a 214, 254 y 280 nm. Se recolectaron fracciones de 1 mL, se rotaevaporaron y liofilizaron, y se resuspendieron en 520 μ L para posteriormente medir la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y FeRP.

Las fracciones con mayor actividad se liofilizaron de nuevo y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.9. Caracterización peptidómica del hidrolizado de subproductos de tomate mediante espectrometría de masas en tándem

Con el objetivo de analizar el perfil peptídico del hidrolizado de subproductos de tomate, las fracciones con mayor actividad antioxidante obtenidas tras la separación por HPLC se analizaron con un espectrómetro de masas con ionización por nanoelectrospray (nanoESI) acoplada a un cuadrupolo-tiempo de vuelo (qTOF) TripleTOF® 5600+ (AB Sciex Instruments, MA, USA).

Para el análisis, 2 µL de muestra a una concentración de 10 mg/mL se introdujeron en una columna tipo trampa (NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 350 µm x 0,5 mm; Eksigent), utilizando como fase móvil 0,1 % TFA en agua a una velocidad de flujo de 3 µL/min durante 5 minutos. A continuación, los péptidos fueron cargados en una columna analítica (LC Column, 3 µm C18-CL, 75 µm x 12 cm, Nikkyo Technos Co.) equilibrada con 5% de acetonitrilo (ACN) y 0,1% de ácido fórmico (AF). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35 % de fase B en A durante 90 minutos a una velocidad de flujo de 300 nL/min (utilizando 0,1 % de AF en agua como fase A y ACN como fase B). Finalmente, los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas nanoESI-qTOF. La muestra fue ionizada aplicando 2,8 kV en el electrospray. El análisis se llevó a cabo en un modo dependiente de los datos (DAD). Los escáneres Survey MS1 se realizaron de 350-1250 m/z para 250 ms. La resolución del cuadrupolo se estableció en "UNIT" para los experimentos MS2, los cuales se realizaron de 100 a 1500 m/z para 50 ms en modo "alta sensibilidad". Se utilizaron los siguientes criterios: carga de +1 a +5; intensidad mínima; y 70 cuentas por segundo (cps). Para la fragmentación después de cada scan se seleccionaron hasta 25 iones. La exclusión dinámica se estableció en 15 s. Además, se incluyó una lista de inclusión definida por el usuario con el método IDA. La sensibilidad del sistema se controló con 2 fmol de 6 proteínas (LC Packings).

Para el tratamiento de los datos se utilizó el motor de búsqueda Mascot v2.7 (www.matrixscience.com). La lista de picos se generó directamente de los archivos wiff del espectrómetro de masas en tándem utilizando los parámetros predeterminados por los motores de búsqueda. La búsqueda en la base de datos UniProt se realizó con el programa Mascot Distiller v2.7.1 software (Matrix Science, Inc., Boston, MA, USA). Los principales parámetros de búsqueda fueron Green plant, sin especificidad de enzima y unos valores de tolerancia de 50 ppm para MS y de 0,3 Da para MS/MS.

2.10. Análisis *in-silico* de los péptidos identificados mediante espectrometría de masas

Para la caracterización de los péptidos identificados se utilizaron herramientas bioinformáticas. En primer lugar, se utilizó el Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>). Este recurso, mediante un ratio (Peptide Ranker ratio, PRR) que va de 0 a 1, indica la probabilidad de que los péptidos sean bioactivos. A continuación, todos los péptidos que obtuvieron un PRR mayor a 0,5 fueron analizados con el AllerTOP v12.0. (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>), que predice la alergenicidad, y con el ToxinPred (http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/multi_submit.php) que predice la toxicidad y las propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad, hidrofiliidad,

impedimento estérico y anfipaticidad. Por último, se comprobó con la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) si alguna de las secuencias identificadas había sido registrada previamente como bioactivas.

2.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis simple de la varianza (ANOVA simple) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII versión 17.2.00 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA). El método empleado para discernir entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudio de la estabilidad a la cocción de la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate

La estabilidad del hidrolizado de subproductos de tomate durante los diferentes tiempos de cocción a 70 °C fue analizada midiendo la actividad antioxidante del hidrolizado tras la cocción y comparándolo con el hidrolizado sin cocción que llamaremos control. La figura 1 muestra la actividad antioxidante de cuatro muestras de hidrolizado de subproductos de tomate (hidrolizado control e hidrolizado cocido durante 5, 10 y 15 minutos) a tres concentraciones distintas 1, 5 y 10 mg/mL y evaluado mediante dos métodos, DPPH (figura 1-A) y FeRP (figura 1-B).

Como se puede observar en la figura 1, tanto por el método DPPH como FeRP, la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo de cocción a ninguna de las concentraciones ensayadas, ni entre el control y los hidrolizados cocidos. Esto podría ser debido a la desnaturalización de las proteínas ya que estaría evitando que los grupos tiol de los aminoácidos Met y Cys reaccionaran con los radicales libres y disminuyese la actividad antioxidante (Mora et al., 2017). Por otro lado, se observa un aumento de la actividad antioxidante a medida que aumenta la concentración, siendo de aproximadamente un 70 % según el ensayo de DPPH y en torno a 0,68 mediadas de absorbancia según el método FeRP a una concentración de 10 mg/mL.

Resultados similares obtuvieron Mora et al. (2017) en muestras de carne de ternera almacenada en refrigeración durante 4 semanas. Independientemente de la semana de almacenamiento en refrigeración y del método de análisis de la actividad antioxidante, en la gran mayoría no había diferencias significativas entre la muestra cocida a 70 °C durante 45 minutos y la muestra control. De la

misma manera, Singh y Vij (2018) observaron un ligero aumento de la actividad antioxidante en péptidos procedentes de leche de soja fermentada respecto a la muestra control al someterlos a una cocción a 75 °C durante 2 horas.

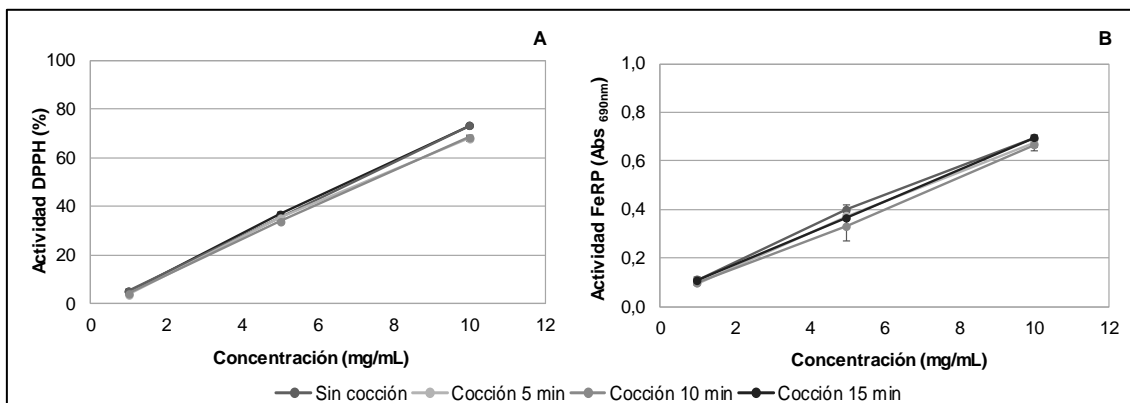


FIGURA 1. Actividad antioxidante de las cuatro muestras antes y después de la cocción (sin cocción y cocción a 5, 10 y 15 minutos) evaluada mediante el método DPPH (A) y el método FeRP (B).

3.2. Estudio de la estabilidad a la digestión gastrointestinal de la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate cocido

La estabilidad a la digestión gastrointestinal de la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate cocido a 70 °C durante 15 minutos fue estudiada midiendo la actividad antioxidante antes y después de esta. La figura 2 muestra la comparativa de la actividad antioxidante de los tres tipos de muestras (hidrolizado, hidrolizado cocido durante 15 minutos e hidrolizado cocido durante 15 minutos y digerido mediante digestión gastrointestinal simulada *in vitro*) a distintas concentraciones (1, 5 y 10 mg/mL) y analizadas mediante los métodos DPPH (figura 2-A) y FeRP (figura 2-B).

Como se puede observar en la figura 2-A, cuando las muestras fueron analizadas mediante el método DPPH, a una concentración de 1 mg/mL la actividad antioxidante no se vio afectada por la digestión gastrointestinal. Sin embargo, a 5 y 10 mg/mL la actividad antioxidante disminuyó de forma significativa ($p < 0,05$) en la muestra cocida y digerida respecto a la muestra cocida, siendo esta disminución de un 8,3% a 5 mg/mL y de un 14,8 % a 10 mg/mL. No obstante, cuando las muestras fueron analizadas mediante el método FeRP (figura 2-B), a las tres concentraciones analizadas se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en la muestra cocida y digerida respecto a la muestra cocida siendo este de 0,08 a 1 mg/mL, 0,16 a 5 mg/mL y 0,29 a 10 mg/mL. Esta disminución de la actividad antioxidante puede ser debida a una degradación de los péptidos por parte de las enzimas, lo que puede exponer grupos internos y liberar aminoácidos libres. Además, esta hidrólisis puede afectar a la cantidad, el tamaño, la estructura, la composición de aminoácidos y la hidrofobicidad de

los péptidos, las cuales son características determinantes de su bioactividad (Gallego et al., 2018).

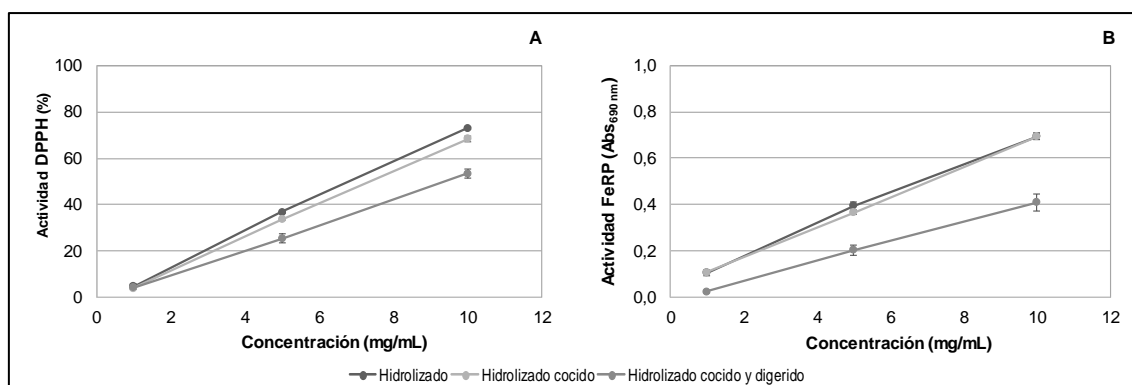


FIGURA 2. Actividad antioxidante de las muestras sin cocción, cocida durante 15 minutos y cocida durante 15 minutos y digerida mediante digestión gastrointestinal simulada *in vitro* y analizadas mediante el método DPPH (A) y el método FeRP (B).

3.3. Fraccionamiento y purificación del hidrolizado de subproductos de tomate mediante cromatografía de exclusión molecular

Con el objetivo de fraccionar la muestra según el tamaño molecular y purificarla seleccionando aquellas fracciones con mayor actividad antioxidante, se realizó una cromatografía de exclusión molecular y se midió la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas.

En la figura 3 se observa el perfil peptídico del hidrolizado de subproductos de tomate tras la cromatografía de exclusión molecular y la actividad antioxidante de las distintas fracciones, analizadas mediante el método DPPH (figura 3-A) y FeRP (figura 3-B).

En cuanto al perfil peptídico, obtenido tras medir la absorbancia de las fracciones a 214, 254 y 280 nm, se puede observar un aumento en la absorbancia desde la fracción 26 hasta la 130. Esas fracciones se agruparon en grupos de 3, con un volumen de elución final de 15 mL, para realizar los análisis de actividad antioxidante. Las fracciones se renombraron siendo la nueva fracción f1, las fracciones 26, 27 y 28 de la cromatografía de exclusión; la fracción f2, las fracciones 29, 30 y 31 y así sucesivamente.

Por otra parte, en relación con la actividad antioxidante de las distintas fracciones se puede observar que mediante el método DPPH (figura 3-A), las fracciones f10, f11 y f12 correspondientes a las fracciones iniciales 53, 54, 55; 56, 57, 58; y 59, 60 y 61 respectivamente, tienen una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, mediante el método FeRP (figura 3-B) las fracciones f9 y f12, correspondientes a las fracciones iniciales 50, 51, 52 y 59, 60 y 61, respectivamente, son las que tienen una mayor actividad. Con lo cual, se seleccionaron las fracciones f9, f10, f11 y f12, se juntaron y liofilizaron para ser fraccionadas mediante HPLC en fase reversa.

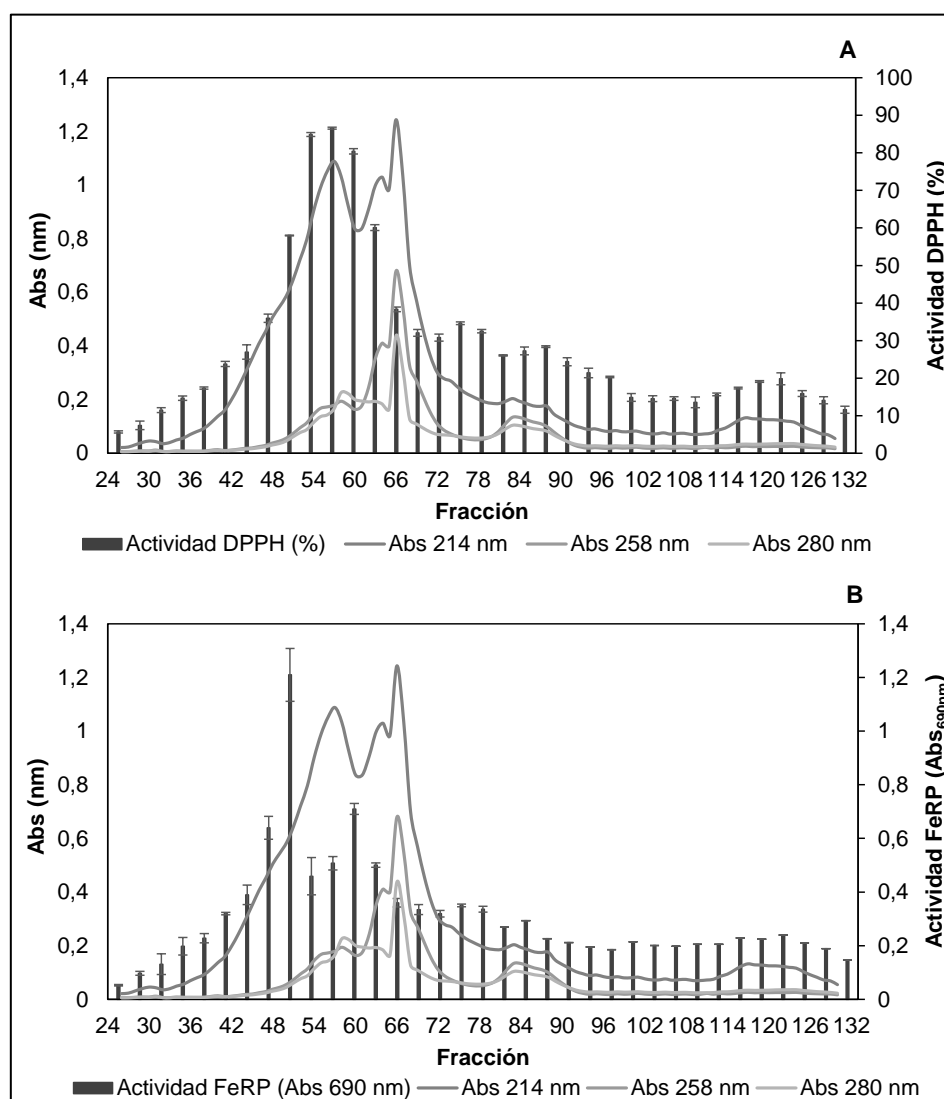


FIGURA 3. Perfil peptídico del hidrolizado de subproductos de tomate obtenido tras la cromatografía de exclusión molecular y actividad antioxidante de las distintas fracciones analizadas mediante el método DPPH (A) y FeRP (B).

3.4. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Los péptidos contenidos en las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular se fraccionaron según su hidrofobicidad, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). En la figura 4 se muestra el cromatograma obtenido tras analizar el conjunto de las fracciones f9, f10, f11 y f12 por RP-HPLC y los resultados de la medida de actividad antioxidante de cada una de las fracciones analizadas. De las 30 fracciones recolectadas, se liofilizaron y analizaron de la 2 a la 29. En la figura 4-A se muestran los resultados de actividad antioxidante de las fracciones analizadas mediante el método DPPH y en la figura 4-B mediante el método FeRP.

Se observa claramente que la fracción 3 es la que mayor actividad antioxidante tiene tanto por el método DPPH como por el método FeRP. Además, las fracciones 12, 13, 16 y 17 presentaron mayor actividad respecto al resto tras medir la actividad mediante el método FeRP. Con lo cual, la fracción 3 y la mezcla de las fracciones 12 y 13, y 16 y 17 fueron liofilizadas para su posterior análisis mediante espectrometría de masas en tándem.

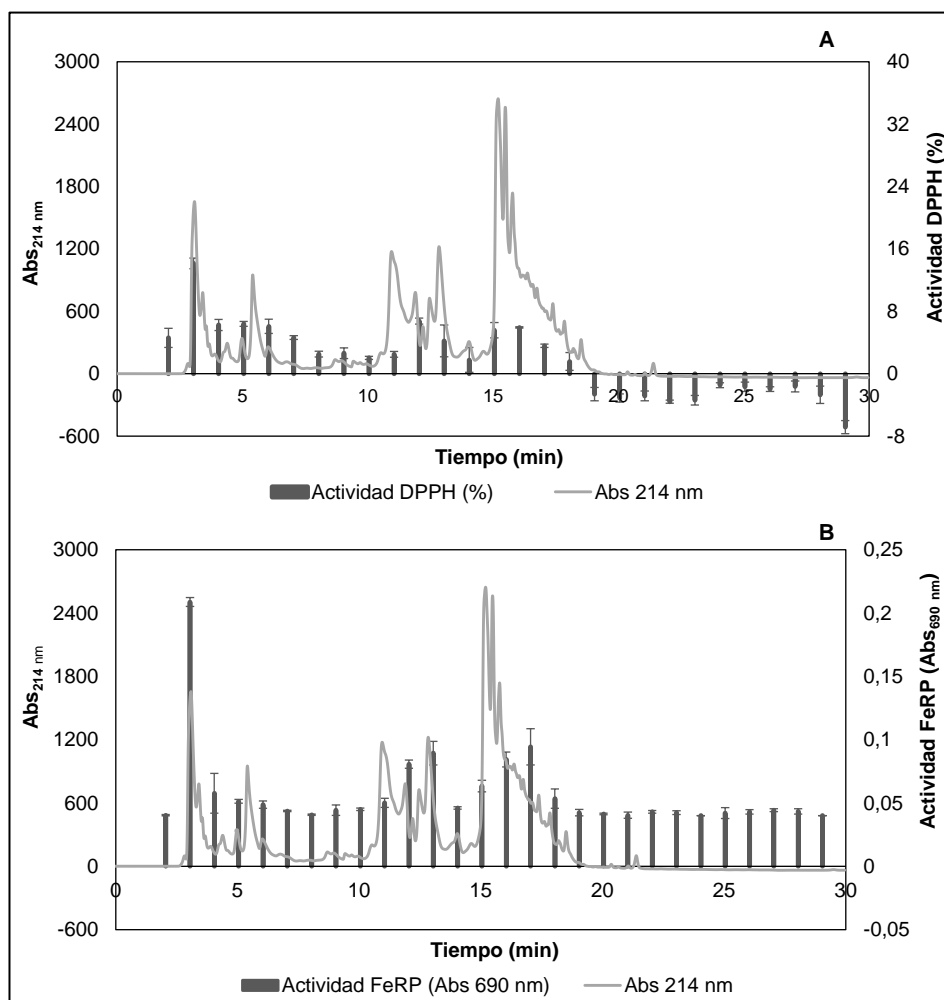


FIGURA 4. Cromatograma HPLC-RP de las fracciones 9, 10, 11 y 12 procedentes de la cromatografía de exclusión molecular y actividad antioxidante de las distintas fracciones analizadas mediante los métodos DPPH (A) y FeRP (B).

3.5. Caracterización peptidómica del hidrolizado de subproductos de tomate mediante espectrometría de masas en tándem

De las fracciones obtenidas tras la separación por HPLC, la fracción 3 y la mezcla de las fracciones 12-13 y 16-17, fueron liofilizadas y analizadas mediante espectrometría de masas en tándem por tener una actividad antioxidante destacada respecto al resto.

Como se muestra en la Tabla 1, en la fracción 3 se identificaron 30 péptidos con masas moleculares entre 600 y 1400 Da. De la misma forma, en la mezcla de las fracciones 12 y 13, se identificaron 42 péptidos (Tabla 2) con masas moleculares entre 557 y 2148 Da. Por último, en la mezcla de las fracciones 16 y 17, se identificaron 80 péptidos tal y como se muestra en la Tabla 3, con masas moleculares comprendidas entre 537 y 1591 Da. La masa molecular es importante ya que determinará, junto con otras características de los péptidos, su facilidad para atravesar la barrera intestinal y ejercer su efecto en el órgano diana (Moayedí et al., 2017).

TABLA 1. Análisis peptidómico de la fracción 3 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

P ₀	Secuencia peptídica	P _f	Nº acceso (UniProt)	m/z	Peso molecular experimental (Da)	Carga (+)	Peso molecular calculado (Da)
Q	GDGPEGS	G	UIMC1_HUMAN	618,26	617,25	1	617,23
A	TIDALGN	E	KCNS1_OTOGA	703,39	702,38	1	702,35
Q	CCQCSYA	S	CTCFL_HUMAN	389,12	776,23	2	776,23
T	CSNPSIQATMNN	N	CRTC3_XENLA	640,25	1278,48	2	1278,53
P	CVCTEADF	D	SORC1_HUMAN	444,19	886,36	2	886,32
K	GAKPVVV	L	NIPBL_HUMAN	335,22	668,43	2	668,42
C	GNMCGQQ	K	RON_HUMAN	369,12	736,23	2	736,26
V	CIGKTCDTSCCQ	-	MTA_CHAAC	631,21	1260,40	2	1260,46
V	KRQARKGSSKKVV	R	RNF8_RAT	736,49	1470,97	2	1470,91
S	FSSDSPQDD	T	BICRA_HUMAN	499,18	996,34	2	996,37
S	ESSMSDFSED	E	UBE2H_BOVIN	567,18	1132,35	2	1132,39
L	GCNGEPC	F	ASB2_BOVIN	340,12	678,22	2	678,21
S	CTSCGSN	K	VM3_BUNFA	336,11	670,21	2	670,21
G	GNGGDVC	L	GTPBA_XENLA	311,13	620,24	2	620,22
G	YGNQNMQGDG	F	TET2_HUMAN	542,19	1082,36	2	1082,41
Q	TGNGCSV	A	LSHR_PIG	637,24	636,23	1	636,25
K	APKKKLP	Q	DMAP1_HUMAN	391,28	780,56	2	780,52
A	GGPAAGCCCRDCCVE	P	KCC1A_HUMAN	722,25	1442,49	2	1442,49
P	PGAHGSC	H	KHNYN_HUMAN	628,22	627,21	1	627,24
E	PAAGADC	K	BHLH9_HUMAN	604,23	603,22	1	603,23
A	EQAPACAMG	P	ATS16_HUMAN	439,16	876,31	2	876,35
R	ESHAASN	D	HMHA1_MOUSE	358,15	714,29	2	714,29
F	PAAGKKVL	S	CCNA1_MOUSE	392,27	782,52	2	782,50
E	LLIVILFTIC	F	SKIT8_MOUSE	252,98	1259,84	5	1259,79
K	AGVSCTC	R	DEF5_RABIT	640,24	639,24	1	639,24
P	PAAQPGC	H	GCM1_MOUSE	322,15	642,28	2	642,28
A	GGFGGMC	L	MCAT_MOUSE	628,25	627,24	1	627,21
L	LLLLPELR	D	MLEC_RAT	532,36	1062,70	2	1062,68
A	EFTCPNC	T	RYDEN_DANRE	407,13	812,25	2	812,28
P	SPGGDAV	E	GANP_HUMAN	602,25	601,24	1	601,27

P₀: Residuo anterior de la secuencia peptídica; P_f: Residuo posterior de la secuencia peptídica.

TABLA 2. Análisis peptidómico de la fracción 11 y 12 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

P0	Secuencia peptídica	Pf	Nº acceso (UniProt)	m/z	Peso molecular experimental (Da)	Carga (+)	Peso molecular calculado (Da)
H	MSEHTKC	P	NUFP1_HUMAN	418,16	834,31	2	834,34
A	VGGTPSDC	R	TYRO3_HUMAN	368,13	734,25	2	734,29
T	PEAARLHSF	P	ASB14_MOUSE	514,25	1026,48	2	1026,52
C	VEEAGFAQC	V	AGRIN_MOUSE	477,19	952,36	2	952,40
L	IMAGSGC	E	HOGA1_XENLA	638,24	637,23	1	637,26
C	AVANGGC	Q	LRP1_MOUSE	296,12	590,23	2	590,25
L	VCVCSGVC	E	HEAT1_DANRE	385,16	768,31	2	768,30
G	PECQQQCEC	V	SREC_HUMAN	534,19	1066,37	2	1066,35
N	LEGSYKCEC	E	LDLR_BOVIN	516,19	1030,36	2	1030,41
C	GNMCGQQ	K	RON_HUMAN	369,12	736,23	2	736,26
R	SGADPAC	A	PLPP6_RAT	620,22	619,22	1	619,23
L	TAILKTNTVKVPKPIKVLDA	P	KT3K_HUMAN	430,69	2148,39	5	2148,32
E	ADADAYEKC	P	F204A_MOUSE	493,18	984,35	2	984,39
T	CKDSTGTVHCSC	P	SCUB2_MOUSE	620,74	1239,47	2	1239,47
N	IIVSIKTGLP	L	PECR_PONAB	208,95	1039,71	5	1039,66
N	QNSEDTVQD	C	SPZ1_BOVIN	518,20	1034,39	2	1034,42
A	GQGTDDVGLDSS	T	UN13C_MOUSE	575,72	1149,43	2	1149,48
N	CLATCFCPN	K	CRVP3_DISTY	486,19	970,37	2	970,37
L	VHCEDCSC	L	SEML_HUMAN	448,12	894,23	2	894,27
W	VDAHMC	E	EXT2_BOVIN	395,16	788,30	2	788,29
-	MSDDNGSGNNC	T	LST1_MOUSE	557,17	1112,32	2	1112,35
V	SGGGACSDTGACTPAR	S	HOOK1_HUMAN	705,76	1409,51	2	1409,57
T	PVDNSTP	V	MUC17_HUMAN	365,16	728,30	2	728,33
A	SEYCCSC	T	CAHM4_MOUSE	449,12	896,22	2	896,22
F	LILVLFPI	A	CYB_HETAO	208,95	1039,71	5	1039,70
E	LPSECGFC	L	CYHR1_BOVIN	428,17	854,33	2	854,33
-	MADSEWDADNF	E	EI3JB_DANRE	708,27	1414,52	2	1414,50
P	VPSGCFEGGAGNC	S	KCNC2_MOUSE	599,22	1196,42	2	1196,46
G	AGGQHAC	A	OPLA_BOVIN	643,25	642,24	1	642,25
L	ANGAAGC	V	MFRN2_DANRE	282,11	562,21	2	562,22
S	CEGANQS	D	ZO29_XENLA	708,26	707,25	1	707,25
Q	LKVLLSGATFLV	T	ZFY21_HUMAN	252,97	1259,84	5	1259,79
S	GLISTKRRKMV	E	PK11P_HUMAN	252,97	1259,83	5	1259,77
V	PGGAGPC	A	CARM1_HUMAN	558,23	557,22	1	557,23
A	KVPLGGV	Q	CK016_HUMAN	335,22	668,43	2	668,42
P	GASSPEC	R	LYAG_BOVIN	650,25	649,24	1	649,24
G	GRGGGAC	S	AHDC1_HUMAN	577,22	576,22	1	576,24
K	CSQGEESYEGPLG	P	ROS1_MOUSE	642,24	1282,46	2	1282,51
V	LVKRHVKL	H	CADHB_XENLA	248,93	991,71	4	991,67
L	QCGEPMC	C	VAR1_VARVA	364,10	726,19	2	726,21
K	SCPCCGT	P	RNF14_HUMAN	670,18	669,17	1	669,19
Q	NCHCHSD	L	CHAD_BOVIN	815,22	814,21	1	814,25

P0: Residuo anterior de la secuencia peptídica; Pf: Residuo posterior de la secuencia peptídica.

TABLA 3. Análisis peptidómico de la fracción 16 y 17 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

P0	Secuencia peptídica	Pf	Nº acceso (UniProt)	m/z	Peso molecular experimental (Da)	Carga (+)	Peso molecular calculado (Da)
E	IFKSGLT	T	ANGP2_MOUSE	383,22	764,42	2	764,44
R	SLALYLP	G	CP090_MOUSE	388,72	775,42	2	775,45
E	TAASCEDF	Q	WFKN1_RAT	843,29	842,28	1	842,31
R	DPQYPPGPPAF	P	TITIN_HUMAN	593,28	1184,55	2	1184,55
R	KVLSGVVMT	T	RED1_MOUSE	467,29	932,56	2	932,54
G	AKVVVLPEC	F	NIT2_DANRE	479,29	956,56	2	956,54
C	DFLEDGEERN	C	NGP_MOUSE	612,26	1222,50	2	1222,51
V	SGTKEGM	V	FAN_MOUSE	709,29	708,28	1	708,31
G	SGQGTPFSYSVPG	Q	NPTXR_MOUSE	642,29	1282,57	2	1282,58
Q	EAMDVTTTST	R	EIF3I_BOVIN	528,21	1054,41	2	1054,45
D	GCCILYS	D	AGRA3_MOUSE	758,31	757,30	1	757,31
F	VCQATGE	P	PTPRF_BOVIN	707,29	706,28	1	706,30
M	APKRQSPLP	L	SETLP_HUMAN	497,27	992,53	2	992,58
Q	VVSTKVG	G	PIGA_MOUSE	345,22	688,42	2	688,41
P	KTGLLMT	I	MAGBA_CANLF	382,24	762,46	2	762,43
G	LPGGARC	F	NDUS6_BOVIN	337,17	672,32	2	672,34
-	MAEAAIDPRCEEQE	E	LSP1_MOUSE	796,32	1590,63	2	1590,67
L	NPSLSGC	Y	CDON_MOUSE	339,15	676,28	2	676,29
F	VNVASFC	G	GPX6_RAT	370,19	738,36	2	738,34
S	SPGRGGG	G	SOCS7_HUMAN	294,16	586,31	2	586,28
P	GPELPPVP	F	SOCS7_HUMAN	403,23	804,45	2	804,44
T	PGELVKY	L	LOXE3_MOUSE	403,23	804,45	2	804,44
Q	SPAAKGG	T	GEMI8_BOVIN	294,16	586,31	2	586,31
E	DAGGLHVLLTAT	P	INSRR_HUMAN	584,30	1166,58	2	1166,63
K	SAHCENT	L	OFD1_MOUSE	381,14	760,26	2	760,28
A	METHNGAED	M	LRRK1_MOUSE	502,19	1002,36	2	1002,37
N	VNTCPSAS	P	CA174_XENLA	778,31	777,30	1	777,33
T	LCSWPGGQSSGVPG	L	UFSP1_MOUSE	666,28	1330,55	2	1330,60
V	GPNSVVC	A	RON_HUMAN	338,15	674,28	2	674,31
C	GNMCGQQ	K	RON_HUMAN	369,12	736,23	2	736,26
A	DCEDQGA	P	DBF4B_XENLA	369,12	736,23	2	736,23
N	NPSGVVC	D	CYB_GENMA	338,15	674,28	2	674,31
A	CLYYCSKDS	S	NHLC2_CHICK	541,22	1080,42	2	1080,43
V	DDNEPEC	Q	ADAM7_MOUSE	821,29	820,28	1	820,25
L	ESDSLTDSES	L	MAGC1_HUMAN	535,21	1068,40	2	1068,41
W	PSEPTTFGPT	G	OTUD4_MOUSE	517,24	1032,47	2	1032,48
S	EYTCGTSPAD	K	HXA9_HETFR	522,23	1042,44	2	1042,39
A	AIMSDTDSDE	D	TAF1_HUMAN	542,19	1082,37	2	1082,41
E	CWQDPSMDMH	N	N42L2_RAT	625,22	1248,43	2	1248,44
A	ESDEDEAH	G	EH1L1_HUMAN	466,15	930,28	2	930,32
E	MGQNEPDQG	G	HCD2_BOVIN	488,18	974,34	2	974,38

P0: Residuo anterior de la secuencia peptídica; Pf: Residuo posterior de la secuencia peptídica.

TABLA 3 continuación. Análisis peptidómico de la fracción 16 y 17 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

P0	Secuencia peptídica	Pf	Nº acceso (UniProt)	m/z	Peso molecular experimental (Da)	Carga (+)	Peso molecular calculado (Da)
H	DTGCIQY	M	TEN4_DANRE	400,16	798,31	2	798,32
E	SEDEFGPNS	F	TEN4_DANRE	491,18	980,35	2	980,37
C	ICCGIGAY	P	CHPT1_DANRE	400,16	798,31	2	798,34
I	MVEEFVQYGPL	D	JAK1_CYPKA	656,32	1310,62	2	1310,62
P	GSPGPEM	E	STKL1_HUMAN	674,27	673,26	1	673,27
G	ESGSSSSKTSTHS	K	FIBA_BOVIN	641,26	1280,51	2	1280,55
L	SMTQSETTSDQSDI	E	CE350_HUMAN	765,29	1528,57	2	1528,62
V	MTMQHGQ	P	UTP15_DANRE	832,31	831,30	1	831,34
S	YGGGGGR	Y	RBMX_BOVIN	623,32	622,31	1	622,28
A	GGGSPPA	T	LRC4B_HUMAN	542,25	541,24	1	541,25
K	MPSASGH	R	OR5DG_HUMAN	686,27	685,27	1	685,29
L	LLILTKT	G	CMKMT_MOUSE	401,29	800,56	2	800,54
E	IISKLLS	E	CMIP_XENLA	387,27	772,53	2	772,51
G	GPSPQAC	P	EI2BD_RAT	330,15	658,28	2	658,27
Y	IHGGGWC	F	AAAD_BOVIN	365,14	728,27	2	728,31
G	GGLVGYG	L	MSGN1_CHICK	622,33	621,32	1	621,31
S	AGFGAAN	L	TRFE_GADMO	304,15	606,28	2	606,28
L	AIKAGEA	D	TRFE_GADMO	330,19	658,36	2	658,37
N	AIKGGVD	D	A2MG_BOVIN	330,19	658,36	2	658,37
F	AIIFFVCILV	I	S5A4A_MOUSE	250,97	1249,81	5	1249,75
L	NPGPPGT	P	ZAR1_TAKRU	320,16	638,31	2	638,30
S	KKAVSLR	T	RPGR1_MOUSE	401,29	800,56	2	800,52
V	AMELANMTSKQ	M	NU5M_CARAU	612,30	1222,58	2	1222,57
H	MDSDSP	S	RNAS1_GORGO	738,23	737,23	1	737,25
R	GKCECGQCTCFP	P	ITGBL_XENLA	638,22	1274,42	2	1274,46
E	MGDTGPCG	P	SYAC_HUMAN	369,12	736,23	2	736,25
N	IIVSIKTGLP	L	PECR_PONAB	208,95	1039,71	5	1039,66
G	GGGGGHP	H	MAF_CHICK	269,64	537,26	2	537,23
Q	GKGGHLA	A	SLA_PHIOL	320,18	638,35	2	638,35
N	FIKVPVV	P	PROC_FELCA	401,28	800,54	2	800,52
S	IIIIHLVEVV	P	CALCR_MOUSE	252,97	1259,83	5	1259,82
A	ASAAGGK	K	ABT1_BOVIN	281,14	560,27	2	560,29
G	FTGSNCEEECM	N	COQA1_MOUSE	625,21	1248,41	2	1248,41
S	MHSAGGG	S	FOXF1_HUMAN	616,25	615,24	1	615,24
A	LGGAGGK	G	MTG2_HUMAN	280,17	558,32	2	558,31
Q	ESDPEDDD	V	PININ_BOVIN	461,14	920,26	2	920,29
T	DCSDGSDEKNDCG	L	ST14_MOUSE	724,23	1446,44	2	1446,43
I	YGAVGSQ	V	MYP0_MOUSE	341,18	680,35	2	680,31

P0: Residuo anterior de la secuencia peptídica; Pf: Residuo posterior de la secuencia peptídica.

Todos los péptidos identificados mostraron entre 7 y 20 aminoácidos, lo que presenta concordancia con los resultados previamente publicados que indican

que los péptidos con mayor bioactividad suelen tener entre 2 y 20 aminoácidos (Moayedi et al., 2017; Moayedi et al., 2018). Además del número de aminoácidos de los péptidos, es muy importante la composición de los mismos. La presencia de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Leu, Val, Gly, Pro y Phe favorece la interacción de los péptidos con los lípidos facilitando así una mayor eliminación de radicales libres. También aumenta la actividad antioxidante de los péptidos la presencia de aminoácidos donantes de electrones como Glu, Met y Asn y los que ejercen actividad quelante como Asp, Glu, His y Trp (Hajfathalian et al., 2018). De la misma manera, la presencia de Cys y aminoácidos aromáticos como Trp, Tyr y Phe aumentan la actividad antioxidante a través de los distintos mecanismos anteriormente mencionados (Gallego et al., 2017). Como se puede observar en las tablas, los péptidos identificados contienen muchos de estos aminoácidos.

3.6. Análisis *in silico* de los péptidos del hidrolizado de subproductos de tomate identificados por espectrometría de masas

Para poder conocer las características de bioactividad, alergenicidad, toxicidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, impedimento estérico y anfipaticidad de los péptidos identificados mediante espectrometría de masas y dar pie a futuras investigaciones, se utilizaron las herramientas bioinformáticas Peptide Ranker, AllerTOP v12.0. y ToxinPred. En las Tablas 4, 5 y 6 se muestran aquellos péptidos con un ratio en Peptide Ranker (PRR) superior a 0,5 y los resultados de las predicciones de las distintas propiedades bioquímicas analizadas.

TABLA 4. Estimación de la bioactividad, propiedades fisicoquímicas, toxicidad y alergenicidad de los péptidos de interés de la fracción 3 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

Secuencia peptídica	PRR	Hidrofobicidad	Hidrofiliidad	Impedimento estérico	Anfipaticidad	Toxicidad	Alergenicidad
GGPAAGCCCRDCCVE	0,95	-0,1	0,1	0,62	0,25	Si	Si
GGFGGMC	0,95	0,22	-0,69	0,64	0	No	No
LLMILFTIC	0,70	0,48	-1,64	0,62	0	No	No
PAAQPGC	0,68	-0,02	-0,26	0,53	0,18	No	No
EFTCPNC	0,66	-0,12	-0,24	0,61	0,18	No	Si
EQAPACAMG	0,66	-0,02	-0,07	0,6	0,28	No	No
GCNGEPC	0,65	-0,13	0,17	0,63	0,18	No	Si
CCQCSYA	0,55	-0,08	-0,76	0,61	0,18	Si	No

Como se puede observar en la Tabla 4, de los 30 péptidos identificados en la fracción 3, 8 péptidos obtuvieron un PRR superior a 0,5, de los cuales, la mitad no han resultado ni tóxicos ni alérgenos según AllerTOP y ToxinPred. Dentro de este grupo, el péptido GGFGGMC es uno de los que potencialmente presenta una mayor bioactividad, con un PRR de 0,95. Este elevado PRR puede ser debido a que el péptido está compuesto mayoritariamente por aminoácidos hidrofóbicos como lo son la Gly y Phe, y además tiene Met y Cys. Además, en

esta fracción también se identificó un péptido con el mismo PRR pero que se predice que es tóxico y alérgico.

TABLA 5. Estimación de la bioactividad, propiedades fisicoquímicas, toxicidad y alergenidad de los péptidos de interés de la fracción 11 y 12 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

Secuencia peptídica	PRR	Hidrofobicidad	Hidrofilicidad	Impedimento estérico	Anfipaticidad	Toxicidad	Alergenidad
SCPCCGT	0,89	-0,03	-0,44	0,57	0	Si	Si
LPSECGFC	0,87	0,05	-0,38	0,59	0,16	No	Si
PGGAGPC	0,81	0,09	-0,21	0,56	0	No	No
CLATCFCPN	0,78	0,07	-0,89	0,58	0	No	Si
VPSGCFEGGAGNC	0,77	0,04	-0,23	0,63	0,1	No	No
SEYCCSC	0,77	-0,12	-0,34	0,61	0,16	Si	Si
QCCEGMC	0,69	-0,09	-0,01	0,68	0,36	No	Si
CSQGEYSYEGPLG	0,66	-0,1	0,13	0,62	0,29	No	No
SGADPAC	0,64	-0,05	0,19	0,57	0	No	Si
SGGGACSDTGACTPAR	0,58	-0,12	0,14	0,59	0,15	No	Si
GRGGGAC	0,54	-0,12	0,21	0,65	0,35	No	No
ANGAAGC	0,54	0,07	-0,33	0,61	0	No	Si

TABLA 6. Estimación de la bioactividad, propiedades fisicoquímicas, toxicidad y alergenidad de los péptidos de interés de la fracción 16 y 17 del hidrolizado tras la separación por HPLC.

Secuencia peptídica	PRR	Hidrofobicidad	Hidrofilicidad	Impedimento estérico	Anfipaticidad	Toxicidad	Alergenidad
DPQYPPGPPAF	0,88	-0,07	-0,19	0,53	0,11	No	No
CWQDPSMDMH	0,84	-0,19	-0,10	0,58	0,27	No	No
GKCECGQCTCFP	0,83	-0,13	-0,06	0,62	0,52	Si	Si
IHGGWC	0,80	0,17	-0,96	0,55	0,21	No	No
AILFFVCILV	0,78	0,53	-1,68	0,65	0	No	No
NPGPPGT	0,71	-0,10	-0,03	0,53	0	No	No
GPSPQAC	0,70	-0,09	-0,14	0,54	0,18	No	No
GSPGEM	0,69	-0,06	0,29	0,58	0,18	No	Si
SLALYLP	0,68	0,22	-1,13	0,53	0	No	Si
LPGGARC	0,67	-0,10	-0,04	0,58	0,35	No	No
SPGRGGG	0,64	-0,21	0,47	0,61	0,35	No	No
DCSDGSDEKNDCG	0,64	-0,38	1,13	0,67	0,35	Si	No
GPELPPVP	0,63	0,04	-0,04	0,50	0,16	No	Si
MGDTGPCG	0,63	-0,02	0,04	0,64	0	No	No
GGGSPA	0,61	0,05	-0,03	0,54	0	No	No
LCSWPGGQSSGVPG	0,60	0,04	-0,47	0,58	0,09	No	No
GCCILYS	0,58	0,18	-1,09	0,63	0	Si	Si
GGGGHP	0,56	0,05	-0,07	0,54	0,21	No	No
NPSLSGC	0,56	-0,07	-0,29	0,57	0	No	Si
SGQGTFPSYSVPG	0,53	-0,01	-0,43	0,59	0,1	No	No
YGGGGGR	0,53	-0,13	0,10	0,68	0,35	No	No
APKRQSPLP	0,53	-0,36	0,47	0,52	0,82	No	No
ICCGIGAY	0,51	0,27	-1,05	0,65	0	Si	No
AGFGAAN	0,51	0,15	-0,54	0,63	0	No	Si
PSEPTTFGPT	0,51	-0,09	-0,04	0,53	0,13	No	No

De la misma forma, como se puede observar en la Tabla 5, de los 42 péptidos identificados en las fracciones 11 y 12, 12 péptidos obtuvieron un PRR superior a 0,5. Según las predicciones, solo 4 de ellos no son tóxicos ni alérgenos, entre los cuales está el péptido PGGAGPC que presenta un PRR de 0,81.

Por último, en las fracciones 16 y 17 (Tabla 6), se identificaron 80 péptidos, entre los cuales 25 obtuvieron un PRR superior a 0,5 y 16 de estos no serían ni tóxicos ni alérgenos. Además, 6 de estos 16 péptidos obtuvieron un PRR entre 0,88 y 0,7 siendo el péptido DPQYPPGPPAF el que mayor PRR obtuvo.

De las tres fracciones y según el análisis *in silico*, los péptidos GGFGGMC, PGGAGPC y DPQYPPGPPAF son los péptidos con mayor PRR que no presentan toxicidad ni alergenicidad. Estos tres péptidos están compuestos mayoritariamente por Gly, Phe, Pro y Ala que, como se ha dicho anteriormente, son aminoácidos hidrofóbicos que favorecen la captación de radicales libres al interactuar con los lípidos, y por tanto podrían ejercer actividad antioxidante.

4. CONCLUSIONES

Los principales resultados de este trabajo concluyen que la actividad antioxidante del hidrolizado de subproductos de tomate es estable a la cocción, sin embargo, disminuye tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Además, tras la identificación mediante espectrometría de masas en tándem y el análisis *in silico* mediante herramientas bioinformáticas de los péptidos obtenidos, se observa que los péptidos GGFGGMC, PGGAGPC, DPQYPPGPPAF podrían ser potenciales candidatos responsables de ejercer un efecto antioxidante y se predice que no serían ni tóxicos ni alérgenos. Para confirmar y concluir estos resultados, se necesitan futuras investigaciones para sintetizar los péptidos y hacer ensayos *in vitro* e *in vivo*.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al CSIC la concesión de la beca JAEIntro2018 (JAEINT_EX18_0585) para la realización del TFM.

6. REFERENCIAS

- Arnal Salinas, M. (2018). Efecto de un recubrimiento de gelatina enriquecida con hidrolizado de subproducto de tomate en lomo de cerdo fresco. Trabajo final de grado. Universitat Politècnica de València.
- Bersuder, P.; Hole, M.; Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181-187.

- Gallego, M.; Mora, L.; Hayes, M.; Reig, M.; Toldrá, F. (2017). Effect of cooking and *in vitro* digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. *Food Research International*, 97, 296-306.
- Gallego, M.; Mora, L.; Reig, M.; Toldrá, F. (2018). Stability of the potent antioxidant peptide SNAAC identified from Spanish dry-cured ham. *Food research international*, 105, 873-879.
- Hajfathalian, M.; Ghelichi, S.; García-Moreno, P. J.; Moltke Sørensen, A. D.; Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(18), 3097-3129.
- Mechmeche, M.; Kachouri, F.; Ksontini, H.; Hamdi, M. (2017). Production of bioactive peptides from tomato seed isolate by *Lactobacillus plantarum* fermentation and enhancement of antioxidant activity. *Food Biotechnology*, 31(2), 94-113.
- Meshginfar, N.; Mahoonak, A. S.; Hosseinian, F.; Ghorbani, M.; Tsopmo, A. (2018). Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *Journal of food science and technology*, 55(9), 3498-3507.
- Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; et al. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Moayedi, A.; Mora, L.; Aristoy, M. C.; Hashemi, M.; Safari, M.; Toldrá, F. (2017). ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using *Bacillus subtilis*: effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(1), 48-64.
- Moayedi, A.; Mora, L.; Aristoy, M. C.; Safari, M.; Hashemi, M.; & Toldrá, F. (2018). Peptidomic analysis of antioxidant and ACE-inhibitory peptides obtained from tomato waste proteins fermented using *Bacillus subtilis*. *Food chemistry*, 250, 180-187.
- Mora, L.; Bolumar, T.; Heres, A.; Toldrá, F. (2017). Effect of cooking and simulated gastrointestinal digestion on the activity of generated bioactive peptides in aged beef meat. *Food & function*, 8(12), 4347-4355.
- Singh, B. P. y Vij, S. (2018). *In vitro* stability of bioactive peptides derived from fermented soymilk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. *LWT*, 91, 303-307.
- Toldrá, F.; Reig, M.; Aristoy, M. C.; Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food chemistry*, 267, 395-404.
- Tsai, S. Y.; Huang, S. J.; Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food chemistry*, 98(4), 670-677.