



**Academia de Ciencias Matemáticas,  
Físico-Químicas y Naturales de Granada**

**PROCESOS ENZIMÁTICOS EN EL  
DISEÑO DE ALIMENTOS**

**DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN  
COMO ACADÉMICA NUMERARIA POR LA**

**ILMA. SRA. D<sup>a</sup>. EMILIA MARÍA GUADIX ESCOBAR**

**Granada, 2019**

Gracias a la vida que me ha dado tanto.  
Me dió el corazón que agita su marco  
cuando miro el fruto del cerebro humano,  
cuando miro al bueno tan lejos del malo,  
cuando miro el fondo de tus ojos claros

Violeta Parra

## PROCESOS ENZIMÁTICOS EN EL DISEÑO DE ALIMENTOS

EMILIA MARÍA GUADIX ESCOBAR

**Excelentísima Sra. Rectora Magnífica de la Universidad de Granada,**

**Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada,**

**Excelentísimos e Ilustrísimos Miembros de la Academia,**

**Queridos amigos y compañeros,**

**Señoras y Señores,**

Hay veces en que tu vida parece pasar en un abrir y cerrar de ojos. Cierro los ojos y me veo caminando por la calle Severo Ochoa, mochila al hombro, mirando a uno y otro lado, nerviosa, acabo de llegar y he de encontrar la Facultad de Ciencias. Al llegar a la entrada principal, todo me sorprende, las zonas verdes que rodean al centro,

el hall con su caótico ir y venir de estudiantes, el mural de una de las paredes, la estructura del techo. Me gusta. Todo irradia modernidad, juventud, optimismo, alegría. Me dirijo al Auditorio, me impresiona, sólo había visto algo así en las películas americanas. En unos minutos comienzan las pruebas de acceso a la universidad. Me prometo a mí misma estudiar aquí... Abro los ojos y me veo en este Salón de Grados, a punto de comenzar la lectura de mi discurso de entrada en la Academia, rodeada de hombres y mujeres de Ciencia, algunos de ellos, profesores que me adentraron en el campo de la Física y la Química, profesores a los que respeto y admiro, y sencillamente, no sé si es real o un sueño. Estoy emocionada. Nunca pude imaginar que tan sabia y docta Institución me aceptase como uno de sus miembros. Quiero por tanto expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada, y en especial a la sección de Físico-Químicas, por elegirme para ser académica de número de esta ilustre institución. Para mí es un honor y una responsabilidad, y quiero manifestar mi compromiso con los objetivos fundacionales de la Academia, así como mi disposición e ilusión para llevar a cabo todo aquello que se me encomiende.

Por mi formación en Ingeniería Química, en ingeniería de procesos, y por mi trabajo durante estos años en el estudio y desarrollo de tecnologías relacionadas con la producción y transformación de alimentos, el tema de mi discurso será sobre "Procesos enzimáticos en el diseño de alimentos".

## INTRODUCCIÓN

La importancia y trascendencia de la alimentación en la vida humana, en la evolución de nuestra especie, no necesita argumentación. Alimentarse es una necesidad biológica, es un instinto vital. Desde que el hombre aparece en la Tierra, una de sus mayores preocupaciones ha sido la de proveerse de alimentos. El desarrollo y evolución de la humanidad están íntimamente relacionados con el desarrollo y evolución de su forma de alimentarse.

En el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua se define *natural* como “perteneiente a la naturaleza, sin artificio, ni mezcla o elaboración”, y *cultural* como “relativo al conjunto de modos de vida, costumbres, conocimientos y grado de desarrollo artístico, científico, tecnológico, industrial, en una época o grupo social”. Desde el inicio, el género *Homo*, se ha diferenciado del resto de animales por su capacidad para manipular, procesar sus alimentos. Por tanto, nuestra forma de alimentarnos no ha sido, ni es, un hecho natural sino cultural. A lo largo de la Historia, nuestra alimentación ha sido y es tan variada como lo ha sido y es la diversidad cultural de los diferentes pueblos que han habitado la Tierra. Como indica Isabel Lugo en su trabajo "Alimentación, cultura y tecnología: diseño global de estrategias" aunque los ingredientes provienen de la naturaleza, la alimentación humana es el resultado de la acción que ejerce el hombre sobre ella para transformarla y convertirla en comestible. El ser humano construye su propia comida cuando la piensa, la produce, la transforma, la consume y la comercializa. Y esa construcción está

basada desde el principio en procesos conscientes de diseño (Lugo, 2015).

Además, los cambios en nuestra dieta, la diversificación de alimentos, la evolución de nuestras habilidades para el aprovisionamiento y preparación, están íntimamente relacionados con muchos de nuestros éxitos adaptativos como especie, de nuestras adquisiciones biológicas y comportamentales.

Hace más de 2.5 millones de años el clima de la Tierra cambió drásticamente, se hizo más frío y seco. Los ecosistemas arbóreos, donde vivían los Australopitecos, se transformaron en paisajes abiertos. La vegetación de hojas tiernas y frutos carnosos, dejó paso a especies más resistentes a la sequía lo que alteró drásticamente los recursos alimentarios de los homínidos. Este cambio ambiental dio como respuesta la aparición de los Parántropos, especie con un cerebro similar al del Australopitecos, pero con un aparato masticador extraordinariamente robusto y potente, capaz de triturar frutos secos, semillas, rizomas y raíces. En cambio, otro grupo de homínidos, las especies del género *Homo*, adoptamos una solución diferente, transformarnos en oportunistas, en ser capaces de aprovechar cualquier recurso que se encontrara a nuestro alcance. Dejamos de ser vegetarianos para convertimos en omnívoros (Mateos and Rodríguez, 2010).

El antepasado más remoto de nuestro género fue el *Homo habilis*, el «fabricante de herramientas». Hace unos dos millones de años, fue el primero en tallar piedras, con bordes romos o afilados, para proveerse de proteína animal. Estos pequeños artefactos le permitían

golpear y romper los huesos de animales que otros depredadores cazaban y acceder a la médula, o bien cortar y proveerse rápidamente de trozos de músculo, de vísceras, que podía consumir o transportar fácilmente. Los homínidos cambiamos nuestra dieta casi exclusivamente vegetariana por otra con más contenido en proteínas y grasa animal, iniciando así un proceso que influiría decisivamente en nuestro modelo de historia biológica, en nuestra organización social como especie, en nuestro desarrollo cerebral, en lograr una capacidad intelectual cada vez más sofisticada y única entre los simios.

Este cambio de alimentación tuvo una consecuencia directa en la anatomía y fisiología del sistema digestivo y nervioso. Los alimentos vegetales son más difíciles de asimilar, el aparato digestivo de un mamífero herbívoro es más largo y complejo que el de un carnívoro. Los primeros representantes del género *Homo* ya no necesitaban un tubo digestivo tan largo porque el componente vegetal de su dieta era menor, y porque probablemente se restringía a las partes más digeribles de los vegetales, como los frutos y los brotes tiernos. Por ello, la longitud del tubo digestivo se acortó. La energía y las proteínas que se hubieran destinado a desarrollar ese tubo digestivo complejo pudieron invertirse en desarrollar otros órganos como el cerebro, dotando a los homínidos de una mayor versatilidad de comportamiento y capacidad de improvisación. Durante la evolución, el aparato digestivo se hizo cada vez más corto a la vez que el cerebro fue incrementando su volumen. Cambiamos tripa por cerebro (Mateos and Rodríguez, 2010).

Tener un cerebro más grande también tenía sus exigencias. El cerebro es un órgano muy caro de mantener. En un humano adulto anatómicamente moderno requiere un 20% del gasto energético total de su cuerpo, pudiendo llegar hasta el 60% de la energía corporal en el momento del nacimiento. El cerebro del *Homo habilis* ya consumía un 15%. Los primeros *Homo* se enfrentaron a la necesidad de convertirse en oportunistas cada vez más eficaces, en buscar continuamente fuentes de energía suplementarias y en agudizar su ingenio desarrollando instrumentos, técnicas y procesos cada vez más complejos, que les asegurasen el alimento. A los primeros “cascahuesos” y “cuchillos” de piedra le siguieron hachas, lanzas, flechas, arcos, hondas, lazos, trampas, anzuelos, arpones... y no solo en piedra, sino también en hueso, asta o marfil que obtenían de sus presas. Estas nuevas herramientas posibilitaron mejorar sus técnicas de caza y diversificar sus piezas, favoreciendo el abatimiento de animales de gran tamaño a distancia, conseguir aves y pequeños mamíferos muy escurridizos y explotar los recursos marinos. Además, los últimos cazadores-recolectores también se convirtieron en “mariscadores” de moluscos, equinodermos y gasterópodos, especialmente de aquellas especies que podían recolectarse en las playas y zonas rocosas con relativa facilidad, como las lapas (Mateos and Rodríguez, 2010). La dieta, por tanto, se hizo cada vez más diversa y completa. Algunos científicos han querido ver en este hecho el origen remoto de la inteligencia humana e incluso el detonante de la aparición del lenguaje oral.



El origen de la inteligencia humana sigue siendo un enigma. A finales de los años 80 y 90 del siglo pasado, un grupo de paleoantropólogos, entre los que destaca Leslie C. Aiello de University College London, Peter Wheeler de Liverpool John Moores University y William R. Leonard de Northwestern University formulan la hipótesis de la emergencia natural de la inteligencia humana a partir de la reestructuración del cerebro posibilitada por el aporte energético que proporcionaría una dieta más variada rica en proteínas y grasa animal (Aiello and Wheeler, 1995; Leonard, 2002). Esta tesis es defendida también por el Dr. Arsuaga en su libro “Los aborígenes. La alimentación en la evolución humana” (Arsuaga, 2003). Incluso hay quienes defienden, como el primatólogo Richard Byrne, de la Universidad de St. Andrews, que la alimentación ha jugado un papel tan importante en la evolución humana como para ser la causa principal de la aparición del lenguaje oral: “el lenguaje apareció en la prehistoria a partir de las secuencias de movimientos desarrolladas para preparar alimentos” (Byrne and Bates, 2007).

Por otro lado, el antropólogo Richard Wrangham, de la Universidad de Harvard, señala el cocinado de los alimentos, el control del fuego, como el gran punto de inflexión de la evolución humana (Wrangham, 2010). La cocción favorece la absorción de proteínas e hidratos de carbono, acelera la extracción de energía, mejora el sabor y reduce el masticado, ventajas clave para nutrir un cerebro hambriento en pleno desarrollo.

Otros investigadores como el Dr. David Geary de la Universidad de Missouri en su artículo “Hominid Brain Evolution” publicado en la

revista *Human Nature* en 2009, prioriza la presión demográfica y el carácter social de los homínidos como fuerzas impulsoras de la evolución y desarrollo del cerebro (Bailey and Geary, 2009).

Fuera lo que fuese el detonante de la inteligencia humana, entendida como la capacidad de abstracción, de comprensión del entorno y resolución de problemas, ésta se materializa en el *Homo sapiens*, el pensador. El *Homo sapiens* tiene capacidad intelectual para conceptualizar y planificar, es estratega, lo que le permite no sólo aumentar sus posibilidades de supervivencia, sino ser capaz de controlar y dominar su entorno. El *Homo sapiens* es un ser social, colaborativo, capaz de compartir y transferir conocimiento. Es sabedor de que los ciclos naturales llevan sus propios ritmos y que los animales y las plantas se adaptan a ellos. Es consciente de que los animales se desplazan buscando nuevos pastos cada estación, conoce sus rutas de migración, vigila y acecha a las manadas, y planifica su ataque en momentos de debilidad para garantizarse la caza. Observa su entorno, investiga a su alrededor, y comienza la recolección selectiva de cereales silvestres buscando las plantas más resistentes y las que producen más grano, hasta obtener variedades domesticadas mucho más productivas que las salvajes. Se convierte en productor de alimentos. Inicia la ganadería y la agricultura, lo que supone una verdadera revolución en la evolución y subsistencia humana al garantizar el alimento y permitir el asentamiento (Mateos and Rodríguez, 2010). Además, esto conlleva una modificación continua y radical del entorno que se transforma en un paisaje humanizado. Por otro lado, la participación del hombre en la propagación y

desarrollo de las especies vegetales y animales domesticadas dio lugar a una selección artificial, eminentemente empírica, que favoreció el incremento de la diversidad genética.

La revolución agrícola y ganadera conllevó un aumento considerable de la disponibilidad de alimentos, y como consecuencia, la aparición y desarrollo de las tecnologías para el tratamiento de excedentes. El *Homo sapiens* desarrolla y potencia las técnicas de conservación y almacenaje: la estabilización en frío en pozos con hielo, la cocción, la desecación y deshidratación al sol de carne y pescado, el ahumado, las mezclas con grasa, la salazón. Desarrolla y potencia las técnicas de procesado en busca de nuevos alimentos: la hidratación, el prensado, la molturación, la fermentación.

El *Homo sapiens* es sabedor que el alimento no solo sacia sino que cura. Parece probable que este conocimiento comenzara también con las primeras pruebas durante la recolección de las distintas plantas y raíces. Es lógico pensar que los primeros homínidos se dieran cuenta de que algunas especies vegetales producían en sus organismos diferentes efectos psicoactivos o curadores como disminución del dolor, del cansancio, euforia, vómitos, purgas, cicatrización de heridas, entre otras. Está bien documentado el uso de alimentos como la miel y numerosas plantas como *viola tricolor*, equinácea, romero, menta, tomillo, adormidera, efedra, en forma de infusiones y fermentados, emplastos o ungüentos, o simplemente ingiriendo ciertas partes como remedios sanadores (Guerra-Doce, 2015). Posiblemente, poco a poco se iría conformando una farmacopea primitiva, y por tanto, la “domesticación” de vegetales en fases más

avanzadas, no solo estuviese motivada por la obtención de alimentos sino también por la necesidad de procurarse otros recursos como medicinas, aceites, especias y fibras textiles.

Especial mención merecen los primeros alimentos fermentados por la diversidad de microorganismos (mohos, levaduras, bacterias e incluso arqueas) asociados a este proceso de transformación. Estos consorcios microbianos son los responsables de las reacciones catabólicas que modifican la composición química de las materias primas de partida convirtiéndolas en alimentos más estables y de más fácil digestión y, en muchos casos, en verdaderos alimentos funcionales, tal y como hoy los definimos, con mayor valor nutricional y con demostrados beneficios para la salud (Campbell-Platt, 1994; Tamang et al., 2016). Es difícil predecir cómo se desarrolló la fermentación ya que es un proceso complejo y poco intuitivo. Posiblemente, los primeros agricultores y ganaderos observarían que, a veces, al almacenar en vasijas cerámicas alimentos azucarados como las frutas, granos o leche, no generaban mal olor y sabor ni se convertían en productos tóxicos, sino que se transformaban en otros alimentos de sabor más ácido o amargo, pero apetecible, que no afectaba a su salud sino todo lo contrario, y que fueron los precursores de las bebidas alcohólicas y las leches fermentadas. Su capacidad de observación y su empirismo, les llevaría por ensayo y error, a seleccionar los sustratos adecuados, a identificar y controlar las variables de operación como temperatura, tiempo, atmósfera que evitaba la putrefacción y llevaba a la fermentación. Este término, fermentación, se acuñó más adelante y procede del latín *fervere*, que

significa hervir, posiblemente estuvo inducido por la presencia de burbujas de dióxido de carbono de la fermentación alcohólica. Para asegurar la fermentación, una técnica que resultó muy útil fue la de incorporar a la materia prima que se deseaba transformar una porción del producto ya transformado, con las características deseadas, lo que hoy denominamos fermento o masa madre. Esta práctica dio lugar a la selección de comunidades microbianas adaptadas a las características del proceso, provocando una rápida especialización genómica a través de mecanismos actualmente estudiados e identificados de hibridación interespecífica, de pseudogenización, de eliminación, modificación o duplicación de ciertos genes o de transferencia horizontal (Douglas and Klaenhammer, 2010; Gibbons and Rinker, 2015; Sicard and Legras, 2011). El *Homo sapiens* “domesticó” también a los microorganismos con capacidades fermentativas y comenzó hace 9.000 años, sin saberlo, el *desarrollo de procesos enzimáticos para el diseño de alimentos*. En la antigua aldea neolítica de Jiahu en China, se han encontrado restos de vasijas de cerámica, que datan del séptimo milenio a.C., en las que el análisis químico de los restos de compuestos absorbidos revela que esos recipientes se utilizaron para la producción por fermentación de una bebida a partir de uvas silvestres, miel y arroz (McGovern et al., 2004).

Estos primeros alimentos fermentados debieron ser rápidamente muy apreciados. El proceso, además de transformar materias primas muy perecederas en productos con una prolongada vida útil, proporcionaba nuevos alimentos con una organoléptica sugerente y en muchos casos de más fácil digestión. Posiblemente muchos de

ellos debieron utilizarse con fines medicinales porque, aunque no lo sabían, eran altamente nutritivos, fácilmente asimilables por el organismo y probióticos, contenían cantidades suficientes de microorganismos con propiedades beneficiosas para la salud. Además, algunos de ellos presentaban niveles considerables de un compuesto que verdaderamente ejercía efectos “mágicos”, etanol.

Por tanto, la alimentación humana se ha destacado desde sus orígenes por la búsqueda continua de nuevos alimentos, por la diversificación de materias comestibles, por su producción, transformación y procesado que garantizaran la disponibilidad, que asegurasen una mayor vida útil, una mayor digestibilidad o mejor estado de salud. En todos estos milenios, siglos, años, sobre todo a partir del siglo XIX, lo que se ha hecho es introducir *Ciencia y Tecnología*, pasar del empirismo, del ensayo y error, a la aplicación del conocimiento y al diseño y control de los procesos.

## **LA REVOLUCIÓN ENZIMÁTICA**

No es la intención ahora hacer una historia sobre los descubrimientos y avances en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, sino simplemente indicar los hitos más significativos que permitan contextualizar las tecnologías alimentarias en la actualidad, especialmente las tecnologías enzimáticas.

Sin lugar a dudas, el descubrimiento del papel de los microorganismos en el deterioro y la putrefacción de los alimentos supuso una auténtica revolución en el procesado de materias primas. Son los trabajos de Appert, Durand y sobre todo Pasteur los que

sientan las bases teóricas de la conservación. Esto, unido al desarrollo de la química en el tema de aditivos y conservantes, al avance de la ingeniería en procesos de transmisión de calor y diseño de nuevos materiales como el acero inoxidable, el aluminio o los plásticos, lo que permite el desarrollo de las tecnologías alimentarias utilizadas en el siglo XX. Estas tecnologías se han basado fundamentalmente en el conocimiento del efecto que la temperatura, el pH, el contenido en agua, el potencial redox, o la presencia de determinadas sustancias, tienen en el crecimiento/destrucción de los microorganismos responsables del deterioro. Se han desarrollado técnicas que ejercen un efecto barrera, que impiden el crecimiento de los microorganismos, como son los procesos de refrigeración, congelación, deshidratación, concentración, empleo de sustancias inhibidoras, glaseado, recubrimiento graso y almacenamiento a vacío o en atmósferas controladas; y se han desarrollado técnicas de destrucción de microorganismos, entre las que destacan la acción antiséptica de los conservantes químicos, y fundamentalmente la acción del calor en los procesos de pasteurización y esterilización. Los procesos de conservación por altas temperaturas, son las técnicas más potentes que tenemos para garantizar la esterilidad comercial que algunos productos necesitan, como los enlatados, o prolongar la vida útil a meses, como en el caso de las leches de consumo. No obstante, los tratamientos térmicos pueden también afectar al valor nutricional de los alimentos y a sus características organolépticas. Afectan a glúcidos, provocando la caramelización o acelerando las reacciones de Maillard; afectan a lípidos favoreciendo la fusión y oxidación de las grasas; afectan a proteínas y vitaminas acelerando su

desnaturalización y desactivación. La diferencia en el orden de magnitud de las constantes cinéticas de los procesos de destrucción de microorganismos y desnaturalización de nutrientes ha permitido optimizar el binomio tiempo-temperatura de tratamiento, procesos HTST (High Temperatura Short Time) y UHT (Ultra High Temperature), minimizando las pérdida de nutrientes, aunque el efecto no es totalmente nulo. Esto ha inducido a seguir investigando y desarrollando nuevas técnicas de conservación no térmicas. Son tecnologías que aplican efectos muy variados, como la inactivación de los microorganismos responsables de la putrefacción por aplastamiento, por formación de poros en las membranas celulares o por alteración de los ciclos de reproducción. Algunas están aún en fase de investigación, otras, un poco más desarrolladas e implementadas en el tratamiento de alimentos muy específicos. Cabe citar aquí las tecnologías de alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsantes de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, pulsos luminosos y radiación gamma. (Gómez et al., 2019; Morales-de la Peña et al., 2019; Stratakos et al., 2019)

Por otro lado, la mejora en general de las condiciones de vida de la población, los avances científicos y tecnológicos, especialmente en Medicina y Nutrición, el mayor conocimiento de la relación existente entre los nutrientes de la dieta y nuestro estado de salud, han propiciado un aumento considerable de la esperanza de vida. Paradójicamente, se han producido también cambios importantes en nuestro estilo de vida (desequilibrios nutricionales por exceso o defecto de determinados nutrientes, conductas sedentarias) que han



dado lugar a la identificación con mayor frecuencia de problemas de salud pública como la obesidad, la diabetes o las enfermedades cardiovasculares. Además, los cambios sociales relacionados con las estructuras familiares y el rol de la mujer, los horarios y desplazamientos laborales, se han traducido en una disminución considerable del tiempo que se dedica a la preparación de los alimentos y ha propiciado que parte de las tecnologías culinarias hayan pasado a la industria alimentaria. Así, el procesado de alimentos ha evolucionado principalmente en dos líneas: hacia el diseño de alimentos que corrijan la ingesta de una dieta no equilibrada, mejoren nuestro estado de salud y ayuden a la prevención de enfermedades, los llamados “alimentos funcionales”, y hacia el diseño de alimentos que nos faciliten y reduzcan las tareas de preparación y cocinado en casa, los alimentos “ready to eat”. Una parte importante de las nuevas tecnologías de procesado se han podido desarrollar gracias a los avances en Biotecnología, y especialmente gracias a lo que podríamos llamar la “Revolución Enzimática”.

Las enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula, son los catalizadores de los organismos vivos.

*“What gives the cell its life and personality are enzymes. They govern all body processes; malfunction of even one enzyme can be fatal. Nothing in nature is so tangible and vital to our lives as enzymes”*  
(Kornberg, 1989)

Su característica principal, propia de la catálisis y común en los catalizadores químicos y bioquímicos, es que aceleran la reacción química en la que intervienen sin consumirse en ella. Actúan estabilizando el estado de transición y disminuyendo considerablemente la energía de activación sin alterar el balance termodinámico de la reacción. El estado final, el estado de equilibrio termodinámico, no se afecta por la presencia del catalizador, simplemente, se alcanza más rápidamente. No obstante hay diferencias significativas entre un catalizador químico y una enzima, éstas últimas son catalizadores mucho más eficaces, capaces de acelerar los procesos en los que intervienen con factores de hasta  $10^{18}$  y en condiciones moderadas de temperatura y pH, frente a factores de  $10^5$  o  $10^7$  característicos de los catalizadores químicos (Franco, 2007). Además, son catalizadores altamente específicos, no sólo de reacción sino también de sustrato.

El concepto de sustancia capaz de inducir un cambio químico con sólo estar presente y que podía actuar en cantidades muy pequeñas, concepto bastante cercano al término moderno de catalizador, era el dado por los alquimistas a los elixires o a la mismísima piedra filosofal. Durante siglos se afanaron en encontrar esas moléculas mágicas capaces de transmutar los metales en oro, o capaces de devolver la juventud e incluso conseguir la inmortalidad. Evidentemente, sus trabajos en este sentido no tuvieron éxito.

Sin embargo, fue el estudio de la fermentación alcohólica el proceso que más contribuyó al conocimiento y desarrollo de las enzimas, y por tanto de la Enzimología (Aragón, 2009). Fue Lavoisier (1743-

1794) quien determinó, por simple análisis elemental, que durante la fermentación se producía la escisión del azúcar en alcohol y dióxido de carbono, y que la levadura o fermento adicionado en forma de sedimento procedente de otra fermentación, se mantenía. Gay-Lussac (1778-1850) defendió que era el oxígeno del aire, al que llamó fermento soluble, el responsable de la fermentación alcohólica frente a la levadura o fermento insoluble (Friedmann, 1981). Todavía no se había dado respuesta al problema central de la enzimología, en los procesos de transformación quién es el catalizador y quién es el sustrato. Sin embargo, los trabajos de Theodor Schwann (1810-1882) demostraron que el fermento insoluble debía de estar presente para que se desarrollase la fermentación, y que ese fermento debía de estar constituido por un organismo vivo, ya que en determinadas condiciones, como por ejemplo temperaturas elevadas, que visiblemente mataban ese organismo, no se producía la fermentación (Fruton, 1999).

*"the exciting principle in the fermentation process must be a material that is evoked and increased by the process itself, a phenomenon that applies only to living organisms".*

No obstante, químicos influyentes de la época como Berzelius (1779-1848) y Von Liebig (1803-1873) rechazaron esta teoría. Curiosamente, Berzelius en su primera teoría general sobre la catálisis química había incluido un ejemplo de un extracto capaz de hidrolizar el almidón más eficazmente que el ácido sulfúrico, lo que él había considerado un catalizador químico, un fermento desorganizado, era una enzima. No fue hasta 1872, gracias a la obra de Pasteur, cuando la comunidad

científica aceptó a los microorganismos vivos como responsables de la fermentación (Pasteur, 1860). Pasteur supuso que dichos catalizadores se hallaban unidos de modo indisoluble a la estructura de las células de la levadura por lo que no podían actuar fuera de éstas, eran los fermentos organizados.

El término enzima, del griego en zýme, “en la levadura”, con el significado de “encontrado en la levadura” fue utilizado por primera vez en 1876 por el fisiólogo alemán W.F. Kühne (1837-1900) para nombrar a los fermentos desorganizados, que como ya se ha dicho eran considerados catalizadores químicos. (Friedmann, 1981)

*"I took the liberty of giving the name enzymes to some of the better known substances that many call unorganized ferments"*

En 1897 tiene lugar un descubrimiento absolutamente trascendental. Hans Buchner se encontraba estudiando diversos extractos de levadura con fines inmunológicos a los que añadió sacarosa a alta concentración por su carácter conservante. Los extractos fermentaron. Fue su hermano Eduard Buchner (1860-1917) el que interpretó los resultados (Aragón, 2009). Demostró que las enzimas podían actuar independientemente de la estructura celular. Se terminó así con la polémica en torno a la necesidad de la célula viva para que la fermentación tuviese lugar y con la distinción entre fermentos organizados y desorganizados. Este descubrimiento puede considerarse el origen de la Enzimología y por ende el de la Bioquímica Moderna. Los extractos libres de células se constituyeron como el punto de partida para el estudio químico de los seres vivos.

El siglo XX se estrenaba como la era de los “cazadores de enzimas”, como les llamó Arthur Kornberg (Kornberg, 1989).

Esenciales fueron los trabajos sobre cinética enzimática de Leonor Michaelis (1875-1949) y Maud Menten (1879-1960). Su teoría sobre la unión de la enzima con el sustrato a través de una localización concreta, el centro activo de la enzima, comenzaba a arrojar luz y explicar los datos cinéticos obtenidos en las reacciones enzimáticas. Importantes fueron también los trabajos de J.B.S. Haldane (1892-1964) justificando la alta eficacia catalítica de las enzimas por la existencia de numerosas interacciones de carácter débil entre el centro activo y el sustrato que distorsionaban a éste asegurando la proximidad y orientación adecuada para la unión (Armstrong, 1930). El periodo comprendido entre 1940 y 1955 constituyó, según diversos autores, una edad de oro para la Enzimología (Franco, 2007). Se descubrieron centenares de enzimas, muchas de ellas se aislaron e incluso se cristalizaron. Se confirmó su naturaleza proteica, se determinaron sus estructuras y propiedades cinéticas, y se profundizó en sus funciones y mecanismos de actuación. Los años 60 destacaron por los estudios de modulación enzimática, procesos de los que se valen las células para el control de la actuación de las enzimas. En 1963 se publicó el modelo de regulación alostérica de Monod (Monod et al., 1963) y en 1966 el de Koshland (Koshland et al., 1966). Años más tarde se descubriría el otro gran mecanismo de regulación enzimática, la regulación por modificación covalente y se analizarían las diferencias y “por qué” de cada uno. El alosterismo se prefiere cuando se necesita una respuesta rápida, del orden de segundos, y no se

requiere gran amplificación ni sensibilidad, mientras que en los casos contrarios, para respuestas lentas, del orden de minutos, y gran sensibilidad es más efectiva la regulación por modificación covalente. Además, muchas enzimas, presentan simultáneamente ambos tipos de regulación, lo que se denomina “multimodulación enzimática” (Sols, 1981).

Evidentemente, la enorme capacidad catalítica de las enzimas y su especificidad despertó el interés de su aplicación industrial, con la finalidad de acelerar los procesos de producción y reducir costes, minimizar la generación de residuos, o simplemente, por su especificidad, ser utilizadas en la cuantificación analítica de un analito en mezclas complejas sin necesidad de concentración o separación previa. No obstante, la escasez de fuentes disponibles y bajos rendimientos de obtención, la fragilidad de la naturaleza proteica de las enzimas, su inestabilidad a altas temperaturas y valores extremos de pH, su necesidad de trabajar en medios acuosos lo que dificultaba tanto su uso en sustratos poco solubles como su recuperación, han sido serios inconvenientes.

Las primeras enzimas con fines comerciales fueron enzimas extracelulares, de carácter hidrolítico, extraídas a partir de tejidos vegetales (bromelaína de la piña, papaína de la papaya y ficina del higo) y animales (tripsina y pepsina de páncreas o estómago porcino o bovino) o producidas mediante procesos de fermentación utilizando microorganismos seleccionados, principalmente bacterias o levaduras.

Un salto cualitativo y cuantitativo en la producción industrial de enzimas ha sido la aplicación de técnicas de biología molecular y de ingeniería genética a la modificación de secuencias, así como el uso de herramientas computacionales en el análisis de datos, es decir, el desarrollo de la Ingeniería de Enzimas y de la Bioinformática (Adrio and Demain, 2014).

Mediante la tecnología del ADN recombinante se han expresado enzimas vegetales, animales y microbianas en microorganismos huéspedes de alta producción como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, entre otros. *E. coli* ha sido ampliamente usado como huésped por su facilidad, rapidez y precisión de modificación genética, pudiendo llegar a acumular hasta un 50% de peso seco en proteína. Organofosfohidrolasas ha sido producidas en *R. eutropha* a 10 g/L. (Barnard et al., 2004). Glucosa oxidasa de *A. niger* se ha obtenido a 9 g/L (Demain and Vaishnav, 2009). *P. pastori* ha sido uno de los huéspedes más utilizados tanto para enzimas extracelulares como intracelulares, consiguiéndose producciones de 14.8 g/L y 22 g/L respectivamente (Hasslacher et al., 1997; Werten et al., 1999). En algunos casos, las técnicas recombinantes han permitido incrementos de la producción de la enzima por un factor de 100 (Soetaert and Vandamme, 2010). Actualmente el 90% de las enzimas de uso industrial son versiones recombinantes (Demain and Vaishnav, 2009).

Por otro lado, las técnicas de mutagénesis dirigida o al azar han permitido la obtención de enzimas con mejores propiedades de estabilidad a altas temperaturas, a pH o con especificidades a sustratos diferentes. La facilidad para alterar a voluntad la secuencia de aminoácidos, para cambiar un aminoácido por otro similar pero con pK diferente, abre las puertas a mejorar la estabilidad de las enzimas frente a pH o la temperatura (Lopez-Camacho et al., 1996). También permite cambiar la especificidad de una enzima e incluso la enantioselectividad. Se ha comprobado que la sustitución de la glutamina 102 en una lactato deshidrogenasa por una arginina la transforma en malato deshidrogenasa (Wilks et al., 1988). En otros casos ha permitido mejorar la tolerancia a la presencia de disolventes orgánicos (Singh, 2010).

La aplicación de los fundamentos de la Ingeniería Química a los sistemas biológicos ha dado lugar a la Ingeniería Bioquímica, centrada en el diseño y desarrollo de los procesos de producción a escala industrial. Ha logrado la optimización de las condiciones de operación de las etapas de reacción, concentración y purificación, maximizando productividad y minimizando costes. Ha dado respuesta a la posibilidad de trabajar con sustratos poco solubles mediante el empleo de sistemas microacuosa y control de la actividad del agua mediante tamices moleculares (Morales-Medina et al., 2018). Ha permitido el reuso de enzimas solubles en reactores enzimáticos acoplado un módulo de ultrafiltración a la unidad de reacción que retiene la enzima y la devuelve al reactor (Guadix et al., 2008). Realmente, con las enzimas se ha ampliado el concepto de



inmovilización de catalizadores, considerando técnicas de inmovilización no sólo las clásicas como fijación a la superficie de un sólido, poroso o no poroso, sino todas aquellas que permitan la reutilización de la enzima. Así, a efectos prácticos, son también consideradas técnicas de inmovilización la insolubilización de la enzima por entrecruzamiento, la encapsulación, el atrapamiento o la confinación en el sistema, entre otras.

Hoy en día, las enzimas son utilizadas en más de 150 procesos de producción facilitando la obtención de unos 500 productos comerciales (Adrio and Demain, 2014) . Por sectores, la industria alimentaria es la gran consumidora de enzimas, con más de la mitad de la producción mundial, si se incluye la fabricación de piensos, seguida muy de cerca por la industria de productos de limpieza. En el sector químico destacan la industria textil y papelera. Cabe resaltar el incremento considerable de procesos enzimáticos para la obtención de biocombustibles, que ha llevado en los últimos años a que el sector energético sea el de mayor crecimiento porcentual y mejores perspectivas de futuro. Otros sectores importantes son la industria farmacéutica y biotecnológica. Las enzimas son utilizadas en la producción de numerosos medicamentos, antibióticos, vacunas, moléculas de diagnóstico así como en las propias técnicas de biología molecular e ingeniería genética. Aplicaciones menores en cuanto a volumen de ventas, pero no por eso menos importantes, son la utilización de sistemas mono o multienzimáticos en el diseño de biosensores y envases activos o inteligentes.

Por el tipo de reacción catalizada, las enzimas más empleadas son las hidrolasas, es decir, las que catalizan la ruptura de enlaces en medio acuoso. Destacan las proteasas con una cuota de mercado de 60% (Adrio and Demain, 2014). En segundo lugar están las oxidorreductasas, seguidas de transferasas como las polimerasas, ocupando las liasas el cuarto lugar.

Las ventas anuales de enzimas se han disparado en los últimos años. En 2010 el mercado de enzimas supuso 3.3 billones de dólares, en 2018 ha alcanzado los 7.1 billones y se estima llegar a los 11.03 billones en 2026 (fuente: Reports and data, 2019). Las empresas que lideran el mercado son la danesa Novozymes y la americana DuPont, con el 75% de la producción mundial de enzimas. Destacan también, aunque con menor cuota de mercado, la alemana BASF, la holandesa DSM y la japonesa Amano.

Es obvio que la aplicación de enzimas en procesos industriales va a seguir creciendo, lo que lleva implícito, por la propia idiosincrasia competitiva del sector, la necesidad de búsqueda de nuevas enzimas o mejora de las existentes. Tanto la composición como las condiciones de operación de los medios de cultivo ejercen presiones de selección sobre los microorganismos, inhibiendo el desarrollo de la mayoría de ellos. Se estima que solamente menos del 1% de los microorganismos terrestres han podido ser cultivados y estudiados en laboratorio, y que podría haber más de 50 millones de especies por descubrir, las cuales, por tanto, serían una valiosa fuente potencial de nuevas enzimas (Singh, 2010).

Atención especial merecen los microorganismos que viven en medios ambientes hostiles para la supervivencia de organismos vivos, como zonas volcánicas o desérticas, géiseres, fondos marinos, aberturas termales abisales, zonas polares, glaciares alpinos, lagos salinos, minas, fuentes carbónicas, entre otras. Son los denominados microorganismos extremófilos, capaces de funcionar bajo temperaturas inferiores a 10°C o superiores a 70°C o incluso por encima de 100°C, a pH inferiores a 2 o superiores a 9, a elevadas concentraciones de sales, a altas presiones o radiaciones. Su estudio ha abierto un prometedor futuro en la ingeniería de enzimas, no sólo por los fragmentos génicos que codifiquen nuevas enzimas y que puedan ser obtenidas y producidas en un organismo huésped, sino porque un mayor conocimiento de las estructuras de estas proteínas y de la secuencias de sus aminoácidos pueden ser usadas como modelo para modificar y diseñar nuevas enzimas mediante técnicas de mutagénesis con propiedades de interés para determinadas aplicaciones industriales.

Se ha demostrado que enzimas de halofitas, con un alto número de aminoácidos con residuos cargados negativamente en su superficie, pueden catalizar reacciones en medios no acuosos (Klibanov, 2001). Enzimas de bacterias del género *Clostridium*, *Thermus* y *Thermotoga*, y de arqueas del género *Pyrococcus* y *Thermococcus* son estables a temperaturas de 60-80°C. En 2009 las ventas de la enzima Taq DNA polimerasa purificada de *Thermus aquaticus* alcanzaron los 500 millones de dólares (de Carvalho, 2011).

Por otro lado, en la era de la genómica y la bioinformática, técnicas como la metagenómica y la minería de datos son herramientas muy útiles para la búsqueda de nuevas enzimas con aplicaciones en Biotecnología. Para el análisis metagenómico es necesario el aislamiento del DNA total de una muestra de un ambiente o población determinados, la secuenciación de los genomas y constitución de una genoteca o biblioteca genómica (del Moral et al., 2015). Las plataformas de segunda generación NGS (Next Generation Sequencing) como MiniSeq, HiSeq 4000, NextSeq 550 de Illumina™ han reducido considerablemente el tiempo necesario para la secuenciación lo que ha dado lugar a una auténtica explosión de información disponible en bases de datos. El uso de herramientas informáticas que permitan confrontar los datos disponibles y encontrar secuencias de fragmentos del DNA que respondan a determinadas funciones o fenotipos específicos cuando los vectores son expresados en un microorganismo huésped, sin duda, va a dar lugar a que los hallazgos de nuevas enzimas crezcan de forma exponencial. En algunos estudios metagenómicos, como los realizados en el Mar de los Sargazos, se han llegado a identificar más de 1 millón de genes que codifican principalmente enzimas tipo esterases, celulasas, lipasas, amilasas y glucosidasas (Venter, 2004), aunque todavía no se han desarrollado enzimas industriales obtenidas por estas técnicas.

## **USO DE ENZIMAS EN ALIMENTACIÓN**

Como ya se ha dicho, el uso de enzimas está muy extendido en la industria alimentaria. Estos biocatalizadores se han introducido en

casi todas las etapas de fabricación: pretratamientos de materias primas, producción, envasado, transporte y almacenamiento. Es el sector industrial de mayor demanda de enzimas comerciales, mejor dicho, de determinadas enzimas comerciales, ya que también es uno de los sectores que cuenta con la legislación más restrictiva para su uso o para la aprobación de una nueva enzima.

Un hecho importante a tener en cuenta es que cuando un conocimiento científico quiere ser aplicado en la obtención de un producto comercial, debe existir el desarrollo tecnológico que lo haga posible y rentable, así como las normativas o leyes que lo permitan, por lo que usualmente, cuando todo el proceso se implementa, la base científica en la que se basa ha sido, o está a punto de ser, mejorada o superada.

Las leyes o normativas que regulan el uso de enzimas comerciales para alimentación dependen de cada país. Esto es una complicación añadida al proceso de producción si se quiere que el producto pueda ser distribuido fuera del ámbito nacional, que obliga a limitar la selección de posibles enzimas, o a particularizar los procesos dependiendo del país al que el producto vaya dirigido. El rizo se riza aún más si la empresa quiere obtener algún tipo de certificación adicional como Kosher o Halal.

Japón cuenta con normativa específica para el uso de enzimas. En otros países, como EEUU y Canadá, las enzimas son consideradas aditivos alimentarios. La FDA (Food & Drug Administration) solo permite el uso de enzimas de fuentes libres de toxinas y organismos GRAS (Generally Recognized as Safe)(Food and Drug

Administration, 2019). Aquellas obtenidas por otros procedimientos deben demostrar su inocuidad con estudios científicos que pueden retrasar su aplicación 5-10 años. En la Unión Europea el uso de enzimas está regulado por el Reglamento CE 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2019). En él se estipula que todas las enzimas para uso alimentario deben ser evaluadas y autorizadas. Para ser autorizadas se debe demostrar, con estudios científicos y ensayos clínicos, que son seguras en las cantidades utilizadas, que están exentas de toxinas, alérgenos, metales pesados, microorganismos patógenos, que son necesarias en los alimentos en los que se autorizan y que no llevan a engaño al consumidor, como especifica el Comité Mixto OMS/FAO de Expertos en Aditivos Alimentarios, JECFA (Joint Expert Committee for Food Additives). Se está a la espera de que la Unión Europea haga pública la lista comunitaria con las enzimas permitidas. La única indicación que existe es que en ella figurarán las siguientes enzimas alimentarias: la invertasa (E 1103) y la lisozima (E 1105) según lo especificado en la Directiva 95/2/CE ; la ureasa, la betaglucanasa y la lisozima utilizadas en el vino, de conformidad con el Reglamento CE 1493/1999. Hasta que se disponga de esa lista, las enzimas son consideradas coadyuvantes tecnológicos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2019).

Hay que señalar, que la diferencia fundamental entre la legislación norteamericana o europea para enzimas alimentarias está en considerarlas un aditivo o un coadyuvante tecnológico. Un aditivo

tiene una función definida en el producto como antioxidante, colorante, estabilizante, entre otras, y debe ser indicado en el etiquetado. Sin embargo, un coadyuvante se adiciona durante el proceso por razones técnicas como, por ejemplo, disminuir la viscosidad, pero no tiene ninguna función en el alimento en sí, normalmente es desnaturalizado durante los tratamientos térmicos y no es necesario su etiquetado. En la catalogación de las enzimas no hay consenso.

Desde mediados del siglo XX se emplean enzimas comerciales en la producción de alimentos. Según la AMFEP (Association of Manufacturer & Formulators of Enzyme Products) la industria alimentaria utiliza más de 55 enzimas diferentes, con finalidades tan diversas como mejorar la productividad, disminuir costes de operación, reducir residuos, aumentar la calidad del producto, prolongar la vida útil del alimento, potenciar aromas o sabores, mejorar la digestibilidad, el estado de salud o ayudar a la prevención de ciertas patologías. Muy implementado está la utilización de pectinasas (EC 3.2.1.) en el procesado de frutas y verduras, que da lugar a una disminución considerable de la viscosidad en frío, reduciendo los tiempos de operación y mejorando los rendimientos de extracción de zumos o elaboración de smoothies (Grassin and Fauquembergue, 1996). El empleo de proteasas animales y bacterianas (EC 3.4.21. - EC 3.4.23.) está muy extendido en la industria láctea, desde la elaboración de quesos hasta la fabricación de leches maternizadas o productos de nutrición clínica (Guadix et al., 2006). Las proteasas vegetales (EC 3.4.22.) son muy utilizadas en

la industria cárnica para ablandamiento de la carne, por hidrólisis de la miosina y el tejido conectivo (Kim and Taub, 1991). También se utilizan para la eliminación de pieles en pescados (Fehmerling, 1973). Más reciente es la introducción de lipasas, para obtener por esterificación o interesterificación lípidos estructurados, grasas más saludables (Marín-Suárez et al., 2017; Morales-Medina et al., 2017), o el uso de transglutaminasa (EC 2.3.2.13) y asparaginasa (EC 3.5.1.1). La transglutaminasa es una aciltransferasa, que cataliza la unión entre el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina y el grupo  $\gamma$ -carboxamida de un residuo de glutamina, lo que permite unir trozos pequeños, y en el caso de carnes o pescados, crear piezas reestructuradas de mayor tamaño y valor comercial. También se utiliza para mejorar texturas en productos elaborados como salchichas y surimis (Motoki and Seguro, 1998). La asparaginasa, hidroliza la asparagina a ácido aspártico y amoníaco, impidiendo así la reacción de este aminoácido con azúcares reductores y formación de acrilamida, al hornear o freír alimentos ricos en glúcidos (Zhang and Zhang, 2007).

Realmente, son innumerables las aplicaciones de la tecnología enzimática en la industria alimentaria. Por su importancia histórica y volumen de ventas citaré algunos ejemplos ilustrativos de enzimas empleadas en la industria láctea y en el procesado de almidones, y por sus perspectivas de futuro, y por ser el tema en el que más he trabajado, hablaré de los usos de los hidrolizados enzimáticos de proteínas en la formulación de alimentos.



### *Enzimas en la industria láctea*

Uno de los sectores con más tradición en el empleo de enzimas para el diseño de un nuevo producto es la industria quesera. Desde hace siglos se ha utilizado un preparado enzimático de procedencia animal, el cuajo, para la coagulación de las caseínas de la leche y formación del queso. El primer cuajo comercial, y por tanto, probablemente, la primera enzima comercial, fue el fabricado por Chr. Hansen A/S en 1874 en Dinamarca (Whitehurst and van Oort, 2009). El cuajo está formado fundamentalmente, entre un 80-90%, por una aspartatoproteasa, la quimosina (EC 3.4.23.4), específica para la k-caseína, obtenida del abomaso o cuarto estómago de rumiantes jóvenes, tradicionalmente terneros. Los riesgos higiénicos asociados a esta fuente de suministro, más aún desde la aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina, la posible heterogeneidad en cuanto a calidad, dado que dependiendo de la edad del ternero la quimosina aparece mezclada con mayor o menor proporción de otra aspartatoproteasa, la pepsina (EC 3.4.23.1), la variabilidad en el suministro y el precio relativamente elevado, han llevado a la utilización industrial de enzimas coagulantes de origen microbiano o a la obtención de quimosina mediante la técnica de ADN recombinante en organismos GRAS. La proteinasa mucorpepsina (EC 3.4.23.23) de *Rhizomucor miehei* es uno de los coagulantes microbianos más utilizados por su mayor termorresistencia, asociada posiblemente a su alto grado de glicosilación. Puede obtenerse también a partir de *Rhizomucor pusillus* o *Cryphonectria parasítica*. El empleo de quimosina recombinante fue autorizada por primera vez en Suiza en 1988. En la actualidad, más del 80% del queso fabricado

en EEUU utiliza la versión recombinante, mientras que en la Unión Europea su aplicación está mucho menos extendida, debido fundamentalmente a las normativas específicas de los quesos de calidad con denominación de origen, y a la falta de acuerdo en la consideración de la quimosina recombinante como un "cuajo animal", tal como corresponde a su estructura y propiedades, o como un "coagulante microbiano", atendiendo a su forma de obtención (Calvo, 2015).

Otra de las etapas limitantes en la fabricación de quesos son los procesos de maduración, responsables de la organoléptica final del producto, y que en el caso, por ejemplo, del queso Cheddar puede durar hasta dos años. Numerosas investigaciones han sido llevadas a cabo con el fin de profundizar en la enzimología del proceso de maduración (Law, 2001), así como ensayos a escala de laboratorio y planta piloto para acelerar por adición de enzimas exógenas esta etapa (Kailasapathy and Lam, 2005; Law and Wigmore, 1982). Sin embargo, solo un número muy reducido de ellos han concluido con un preparado enzimático comercial de eficacia probada en el proceso de maduración. Accelase® de DuPont, formulado con proteasas, aminopeptidasas y esterases, es el más utilizado en quesos tipo suizo para disminuir el tiempo de maduración de 9 a 5 meses y potenciar el sabor (Law and Wigmore, 1983).

El uso de la  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) conocida como lactasa, está actualmente muy implementado en la industria láctea. Esta enzima hidroliza la lactosa en D-glucosa y D-galactosa. La hidrólisis se realiza tanto con fines nutricionales como es la formulación de productos

deslactosados para intolerantes a la lactosa, como tecnológicos para imposibilitar la cristalización del disacárido en la fabricación de helados. En algunos casos la hidrólisis se lleva a cabo por motivos medioambientales y de economía circular como es transformar un vertido tradicional de la industria quesera, el lactosuero, altamente contaminante por su valor de DBO, en un concentrado de proteínas de alto valor biológico y en un sirope de lactosa hidrolizada, que multiplica su poder edulcorante por 5, y que es utilizado en la formulación de postres lácteos. La lactasa puede obtenerse de fuentes animales, aunque por razones de homogeneidad y precio a nivel industrial se prefieren las enzimas microbianas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces lactis* (Al-Manhel, 2018). El proceso puede llevarse a cabo en reactores discontinuos y en reactores de lecho fijo con la enzima inmovilizada, que dan lugar a un aumento de la eficacia de la hidrólisis de un 70% a un 90% (Whitehurst and van Oort, 2009).

De reciente incorporación es el uso de la enzima transglutaminasa (EC 2.3.2.13). Varios estudios han demostrado que su uso aumenta las propiedades emulsificantes de las proteínas lácteas (Hinz et al., 2007), mejora la viscosidad y textura en yogures (Ozer et al., 2007) y alarga la vida útil del producto (Motoki and Seguro, 1998)

Otras enzimas son utilizadas en las etapas de estabilización como la lactoperoxidasa (EC 1.11.1.7), por su “esterilización en frío” debido a su efecto bactericida sobre bacterias gram-negativas y bacteriostático en gram-positivas (Law and John, 1981). En la fabricación de quesos tipo Gouda, Padano y Emmental se utiliza la lisozima (EC 3.2.1.17)

como método de control para impedir la hinchazón tardía y texturas no deseables. Esta enzima inhibe la fermentación butírica por su acción bactericida sobre *Clostridium tyrobutyricum* (Tucker and Woods, 1995).

### *Enzimas en el procesamiento de almidones*

Otra de las primeras aplicaciones de enzimas en la industria alimentaria ha sido en el procesamiento de almidones, con la finalidad de hidrolizar la amilosa y amilopectina en moléculas de menor tamaño y mayor solubilidad, a la vez que se potencia el poder edulcorante. Básicamente las enzimas utilizadas pueden agruparse en tres tipos: i) hidrolasas que actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4 y/o  $\alpha$ -1,6 glicosídico, como la  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2), maltoamilasa (EC 3.2.1.133), isoamilasa (EC 3.2.1.68) y amilopululanasa (EC 3.2.1.1/41); ii) transferasas que rompen enlaces  $\alpha$ -1,4 y forman nuevos enlaces  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6, como la glucanotransferasa o enzima ramificante (EC 2.4.1.), cyclodextrin glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19) y amilomaltasa (EC 2.4.1.25) e iii) isomerasas como la glucosa isomerasa (EC 5.3.1.18). Diferentes combinaciones de estas enzimas han permitido obtener a partir del almidón distintos tipos de jarabes (jarabe de dextrinas, jarabe de maltodextrinas, jarabe de maltosa, jarabe de glucosa, jarabe de glucosa/fructosa) muy utilizados en la formulación de bebidas carbonatadas, productos de pastelería y bollería, helados, salsas, alimentos infantiles o conservas (Whitehurst and van Oort, 2009). La empresa americana Clinton Corn Processing Company fue pionera en el desarrollo de procesos enzimáticos de almidón, produciendo desde los años 70 un jarabe de almidón de

maíz con un 42% en fructosa (HFCS). Actualmente, su producción anual es de más de 8 millones de toneladas, representando la mayor aplicación comercial de enzimas inmovilizadas en la industria (Whitehurst and van Oort, 2009).

Otros procesos enzimáticos de interés tecnológico e industrial son la producción de isomaltooligosacáridos (IMO), de ciclooligosacáridos y de almidones ramificados o almidones resistentes.

Los isomaltooligosacáridos, fundamentalmente isomaltosas e isomaltotriosas, son valorados como prebióticos. Pueden obtenerse a partir de jarabes con alta concentración en maltosa mediante la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (EC 3.2.1.3) fúngica de *Aspergillus niger*, o mediante la combinación de la maltoamilasa (EC 3.2.1.133) de *Bacillus stearothersophilus* y la  $\alpha$ -glucanotransferasa (EC 2.4.1.18) de *Thermotoga maritima*. En este último procedimiento, la combinación de las dos enzimas permite conversiones de hasta un 68%. (Lee et al., 2002)

Las ciclodextrinas, glucooligosacáridos cíclicos de 6-8 moléculas de glucosa, tienen interés en la industria alimentaria como fibra dietética totalmente fermentable. Son ampliamente utilizadas en la formulación de productos lácteos, bebidas y repostería. Se comercializan bajo la marca Cavamax W6® de Wacker Chemie, producidas a partir de almidón con la enzima ciclodextrin glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19) de *Klebsiella oxytoca* expresada en *Escherichia coli* K12 (Biwer et al., 2002). Además, su configuración les confiere carácter hidrofílico externo e hidrófobo interno, por lo que

pueden ser utilizadas para la estabilización de compuestos volátiles y lábiles, así como para la disminución de colesterol (Radu et al., 2016) (Somogyi et al., 2006).

El empleo de glucanotransferasas (EC 2.4.1.) permite la obtención de dextrinas ramificadas, dextrinas de digestión lenta, muy interesantes para el control de la glucosa en sangre, y por tanto para la prevención de diabetes tipo II. En un trabajo reciente Zhang *et al.* comparan los carbohidratos ramificados obtenidos mediante enzimas ramificantes de organismos termófilos (*Thermus thermophilus*, *Thermococcus kodakarensis*, *Rhodothermus marinus* y *Petrotoga mobilis*) (Zhang et al., 2019). También se ha descrito el uso de amilomaltasas (EC 2.4.1.25) de *Thermus thermophilus* (van der Maarel et al., 2005) y *Pyrobaculum aerophilum* (Kaper et al., 2005) para obtener geles termorreversibles. La empresa holandesa Avebe comercializa un almidón tratado, Etenia ®, que puede ser utilizado como gelificante o sustituto de grasas en productos lácteos (Alting et al., 2009).

## **PÉPTIDOS Y BIOPÉPTIDOS**

De especial interés científico e industrial es el empleo de proteasas para la obtención de péptidos y biopéptidos. Uno de los constituyentes básicos de los alimentos son las proteínas. Éstas pueden ser aisladas de alimentos de origen animal como carne, pescado, huevos, leche, y de algunos alimentos de origen vegetal como legumbres, cereales y frutos secos. La mayoría son bastante insolubles y presentan problemas de alergenicidad, lo que limita su uso como ingredientes para la formulación de un nuevo producto en

la industria alimentaria. Uno de los métodos que permite modificar estas propiedades es la hidrólisis enzimática de las proteínas a péptidos más pequeños. Hay una gran variedad de proteasas que catalizan la rotura de determinados enlaces peptídicos. Las proteasas se clasifican según la fuente de la que proceden en proteasas de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico; según su acción catalítica en endopéptidasas o exopéptidasas; según la naturaleza del centro catalítico en serinoproteasas, cisteinoproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas. La reacción de hidrólisis supone la rotura del enlace existente entre los aminoácidos que componen la proteína, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto. Además, los grupos carboxilo y amino libres formados tras la hidrólisis estarán parcialmente ionizados dependiendo del pH del medio. Los valores de pK a 25°C para proteínas se estiman entre 3.1-3.6 para la protonación del grupo carboxilo y entre 7.5-7.8 para la desprotonación del grupo amino. Por tanto, el grupo carboxilo estará totalmente protonado a pH inferior a 2, parcialmente disociado entre pH 2 y 5 y totalmente disociado para pH mayor de 5. Asimismo el grupo amino estará protonado para pH menor de 6, parcialmente protonado a pH entre 6 y 9.5 y desprotonado por encima de pH 9.5.

La consecuencia inmediata es que la hidrólisis de proteínas no sólo implica la formación de péptidos más pequeños, sino que lleva consigo cambios de pH, cambios de osmolaridad, pérdida de la estructura globular y aparición de grupos polares y restos hidrofóbicos. Todo ello modifica propiedades tecnológicas de las proteínas como la solubilidad, adsorción de humedad, capacidad

emulsificante, poder espumante y viscosidad, entre otras. La rotura de enlaces modifica también características organolépticas como el sabor, y ejerce efectos positivos sobre la digestibilidad, la absorción intestinal y la alergenicidad.

Numerosas investigaciones se realizaron durante la década de los 90 en este sentido. Pioneros fueron los trabajos realizados por Jens Adler-Nissen y Per Munk Nielsen. *Enzymic hydrolysis of food proteins* (Adler-Nissen, 1986) y *Functionality of protein hydrolysates* en *Food Proteins and their applications* (Damodaran and Paraf, 1997), han sido estudios de referencia.

En general, la hidrólisis mejora la solubilidad de las proteínas, debido a que la rotura de enlaces da lugar a péptidos de menor tamaño y además aumenta el número de grupos polares. Este hecho es especialmente importante en el caso de las proteínas de cereales o leguminosas que son poco solubles en medio acuoso. La proteína de soja es muy insoluble, menos de un 5% a pH 4.2, mientras que tan sólo con un grado de hidrólisis del 8% aumenta su solubilidad a un 75% en el rango de pH 2-8 (Adler-Nissen et al., 1983). El gluten de trigo presenta un comportamiento análogo, si se hidroliza en torno a un 10% es 7 veces más soluble a pH neutro.

El proceso de hidrólisis incrementa la adsorción de humedad por parte de la proteína, ya que este fenómeno está también relacionado con el número de grupos iónicos presentes, que se ve incrementado no sólo por la rotura de enlaces peptídicos, sino también porque la pérdida de la estructura globular de la proteína deja al descubierto grupos iónicos antes enterrados u ocultos. En el caso de los



hidrolizados de soja y proteínas del lactosuero este aumento es muy significativo, los hidrolizados triplican su capacidad (Chiang et al., 1999), lo que supone una modificación de la textura del alimento al que se incorporan, mejorando su palatabilidad. Son muy usados en alimentos para mascotas y barritas energéticas.

Asimismo, se ha comprobado que una hidrólisis limitada favorece la actividad emulsificante, debido a la mayor exposición de grupos hidrofóbicos, mientras que una hidrólisis excesiva la disminuye, lo que se relaciona con la pérdida de la estructura globular de la proteína, que da lugar a una capa más fina de material proteínico alrededor de la gota de aceite y por tanto a una emulsión menos estable (Mietsch et al., 1989). Numerosos estudios han demostrado a su vez que la hidrólisis aumenta el poder espumante de las proteínas pero que disminuye la estabilidad de la espuma formada (Mietsch et al., 1989). Obviamente, la rotura de enlaces y el desdoblamiento de la proteína va a favorecer el reagrupamiento de péptidos y la formación de una película en la interfase agua-aire, de ahí el aumento de la capacidad espumante hasta un cierto grado de hidrólisis, ahora bien, la película que se forma no es lo suficientemente gruesa ni viscoelástica como para dar estabilidad a la espuma. A grados de hidrólisis altos, esto se invierte, el hidrolizado presenta actividad espumante muy baja, pero la espuma formada es muy estable (Don et al., 1991). El control de la reacción permite obtener hidrolizados adecuados para su uso en salsas, helados o repostería.

La hidrólisis modifica también la viscosidad de la proteína. En este sentido, dependiendo del origen del sustrato, la enzima empleada y

las condiciones de operación, se puede disminuir o aumentar, según convenga. En general, la viscosidad disminuye al aumentar el grado de hidrólisis, y de manera más eficiente cuando se emplean serinoproteasas, pero en determinados casos, normalmente a concentraciones altas de proteína, en rangos de pH 2 o 3 unidades más bajos que el pH óptimo de hidrólisis, y en tiempos cortos se forman geles. Una enzima muy estudiada ha sido una endoproteasa obtenida de *Bacillus licheniformis* con especificidad sobre el ácido glutámico, capaz de un aumento drástico de la viscosidad en hidrolizados de proteínas del lactosuero en el rango de grado de hidrólisis de 4-6%, causado por la agregación de péptidos en presencia de calcio (Otte et al., 1997)

En cuanto a los efectos de la hidrólisis enzimática en el valor nutritivo, se ha comprobado que se mantiene el valor de la proteína de partida y que además la hidrólisis aumenta la digestibilidad y favorece la absorción intestinal. La alergenicidad se reduce considerablemente como consecuencia de la hidrólisis. En el caso de la caseína, se pasa de  $10^6$   $\mu\text{g}$  de caseína activa inmunológicamente/gr de proteína a 103.7  $\mu\text{g}$  a grados de hidrólisis de 24%, lo que implica una reducción del 99.5 %, llegando a valores de 99.95 % a grados de hidrólisis de 55% (Mahmoud et al., 1992). Resultados similares se han obtenido para proteínas del lactosuero (Guadix et al., 2006).

Como efecto negativo, la hidrólisis modifica el sabor de los productos. A determinados grados de hidrólisis aparece un cierto amargor, asociado a determinadas fuentes de proteína y al aumento de restos hidrofóbicos. Se ha comprobado que está provocado por

péptidos relativamente pequeños, péptidos de 4 a 15 aminoácidos. Dependiendo del uso final del hidrolizado, esto puede ser un problema a solucionar, bien enmascarando el sabor, con una hidrólisis controlada que limite la formación de esos péptidos, o llevando la hidrólisis a límites mayores y obteniendo péptidos de menor tamaño (Saha and Hayashi, 2001).

Una de las líneas de investigación de nuestro Grupo es la obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas. En esta línea, el Grupo ha puesto a punto métodos para el control de la reacción (Camacho et al., 2001) y la determinación de la distribución de pesos moleculares (Tello et al., 1994). Para las proteínas del lactosuero bovino se han desarrollado modelos cinéticos y se ha optimizado el proceso de hidrólisis en reactores de membrana, tanto en modo continuo como discontinuo, para la obtención de hidrolizados hipoalergénicos utilizados como fuente de nitrógeno en la formulación de leches maternizadas o en productos para nutrición clínica (Guadix et al., 2006; Prieto et al., 2007) (Prieto et al., 2010). También se ha desarrollado el proceso de obtención de abonos foliares, enriquecidos en aminoácidos libres, a partir de harinas de sangre (Pérez-Gálvez et al., 2011).

Compañías internacionales como Abbott, Arla Foods, DSM, Novo Nordisk o Sanovo Foods, entre otras, cuentan con productos comerciales de proteína hidrolizada para su uso en la fabricación de bebidas fortificadas, suplementos para deportistas, alimentos infantiles hipoalergénicos o preparados hipercalóricos para nutrición

clínica, registrados con la marca Peptigen®, PeptoPro®, Vital Peptide®, Peptamen® o Benefit®

Por otro lado, las proteínas de origen alimentario han sido descritas como una importante fuente de péptidos bioactivos (Korhonen and Pihlanto, 2006). Estos compuestos, además de su valor nutricional, deben generar un efecto biológico medible y beneficioso para la salud sin provocar problemas de toxicidad o efectos mutagénicos (Möller et al., 2008). Los péptidos biológicamente activos se encuentran encriptados en la secuencia de la proteína nativa y deben ser liberados para que puedan ejercer su función. La hidrólisis enzimática con proteasas, por su especificidad de acción y condiciones moderadas de pH y temperatura, es el procedimiento idóneo para producir estos biopéptidos. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en los últimos años con la finalidad de caracterizar e identificar las secuencias de aminoácidos que conforman péptidos capaces de modular acciones sobre el sistema inmune, gastrointestinal, cardiovascular y nervioso; péptidos con efecto inmunomodulador, opioide, antimicrobiano, antitrombótico, antioxidante, anticolesterolémico, entre otros (Pihlanto, 2006) (Hartmann and Meisel, 2007) (Sánchez and Vázquez, 2017) (Bhandari et al., 2019). Entre las proteínas alimentarias estudiadas, las lácteas han mostrado ser una de las fuentes de péptidos bioactivos más importantes (Hernández-Ledesma et al., 2014), aunque también se han identificado biopéptidos en un gran variedad de proteínas de diversos orígenes tales como carne, pescado, huevo y cereales (Chalamaiah et al., 2018) (Lee and Hur, 2017). Realmente, los péptidos

bioactivos son considerados la nueva generación de reguladores biológicamente activos, capaces de prevenir la oxidación o el deterioro por microorganismos en los alimentos así como mejorar el tratamiento de varias enfermedades o desórdenes metabólicos, incrementando notablemente la calidad de vida del individuo. Estas expectativas de aplicación han incentivado a la comunidad científica y a la industria alimentaria a impulsar el desarrollo de nuevos aditivos o alimentos funcionales basados en estos péptidos.

La base de datos Biopep recopila más de 1500 péptidos bioactivos (Singh et al., 2014)(Sánchez and Vázquez, 2017). Sin embargo, en la mayoría de los casos las bioactividades están determinadas mediante ensayos in vitro. Se dispone de pocos ensayos clínicos in vivo tanto en animales como en humanos. Además, hacen falta más estudios que profundicen en sus mecanismos de actuación a nivel metabólico y que correlacionen estructura y función. Es necesario también disponer de más estudios de biodisponibilidad, que aseguren que estas secuencias no son alteradas por los procesos de digestión y absorción intestinal y que lleguen intactas al punto donde deben ejercer su acción. Por otro lado, a nivel tecnológico es necesario el estudio y desarrollo de los procesos de reacción, concentración/purificación y estabilización que permitan obtener estos péptidos a escala industrial para su uso en formulación de alimentos funcionales. Así, es también necesario disponer de estudios de los efectos que la inclusión en matrices, o el procesado tiene sobre la bioactividad.

### *Péptidos antihipertensivos*

Una de las líneas más estudiadas es la obtención de péptidos con capacidad antihipertensiva. La hipertensión o presión sanguínea elevada, por encima de 140/90 mmHg, afecta aproximadamente al 30% de la población adulta y es uno de los mayores riesgos para padecer enfermedades cardiovasculares y problemas renales. En algunos casos, la práctica de hábitos de vida saludables como el ejercicio físico de forma regular, dietas equilibradas, reducir la ingesta de sal, reducir el nivel de estrés y no fumar pueden mejorar los valores de presión sanguínea (Kearney et al., 2004). En la actualidad se cuenta con una serie de medicamentos para tratar la hipertensión que incluyen diuréticos, vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, bloqueadores de Angiotensina II e inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina I en Angiotensina II (ACE). En EEUU se estima que el tratamiento de la hipertensión tiene un costo de más de 130 billones de dólares anuales (Kirkland et al., 2018). Así, tanto desde un punto de vista científico como comercial se ha reconocido el potencial de disponer de péptidos procedentes de proteínas alimentarias como agentes antihipertensivos para la prevención o mejora de la hipertensión.

La regulación de la presión sanguínea es compleja, en ella intervienen varias rutas metabólicas que se entrecruzan. Entre los mecanismos más estudiados está la inhibición de la enzima ACE (EC 3.4.15.1) *in vitro*. ACE es una dipeptidil carboxipeptidasa, involucrada en los sistemas renina-angiotensina (RAS) y quinina-óxido nítrico (KNOS). En RAS, ACE cataliza la reacción de transformación de Angiotensina

I, un decapeptido presente en el plasma sanguíneo, a Angiotensina II, un octapeptido con poder vasoconstrictor. En KNOS, ACE inactiva la Bradiquinina que estimula la conversión de L-arginina en óxido nítrico, un potente vasodilatador. Ambos efectos provocan un aumento de la presión sanguínea (Johnston, 1992), y por tanto la inhibición de esta enzima ayuda al control de la presión arterial alta. Actualmente se dispone de inhibidores sintéticos de ACE como Captopril, Enalapril y Lisinopril que constituyen los principios activos de medicamentos para la hipertensión. Sin embargo, su uso está asociado a efectos secundarios como tos, mareos, cefaleas, angioedema, erupciones en la piel, hipotensión, pérdida del gusto, insuficiencia renal y anomalías fetales (Zipes et al., 2019). Numerosos péptidos inhibidores de ACE se han obtenido por hidrólisis enzimática de proteínas lácteas (caseína y proteínas del lactosuero), ovoalbúmina, alga roja, soja, maíz, gluten de trigo, gelatina, proteínas cárnicas, proteínas de pescado, entre otras (Vercruyssen et al., 2005) (Guang and Phillips, 2009) (Wijesekara and Kim, 2010). Además, se ha comprobado que al contrario que los fármacos inhibidores de ACE comerciales, estos péptidos no muestran efectos secundarios, incluso a dosis altas (Ishida et al., 2011).

Otro posible mecanismo de regulación de la hipertensión es la inhibición de la renina, ya que ésta interviene en la formación de la Angiotensina I. Se han encontrado péptidos, entre otros de proteína de guisante, capaces de inhibir tanto a la renina como a ACE (Li and Aluko, 2010), por lo que posiblemente estos péptidos podrían ejercer

en vivo efectos más potentes que los que solo inhiben a ACE (Udenigwe et al., 2009).

En 1988 se descubre uno de los vasoconstrictores más potentes, la Endotelina (ET-1), sintetizada por el endotelio vascular (Yanagisawa et al., 1988). Por tanto, otra de las vías de actuación de la hipertensión es mediante péptidos inhibidores de la enzima convertidora de endotelina (ECE). Se han aislado péptidos inhibidores de ECE a partir de hidrólisis con pepsina de proteínas cárnicas y de pescado (Okitsu et al., 1995). Se ha comprobado también que algunos péptidos inhibidores de ACE inhiben a su vez a ECE, tal vez de forma indirecta a través de la ruta metabólica de la bradiquinina (Maes et al., 2004).

Además, en ensayos clínicos se ha observado que péptidos con actividad opioide como  $\alpha$ -lactorfina ( Tyr-Gly-Leu-Phe) y casoxina D (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro-Phe) disminuyen la tensión arterial (Nurminen et al., 2000) (Yoshikawa, 1994). Se ha sugerido que su acción podía ser ejercida a nivel de tracto intestinal y que por tanto no necesitarían ser absorbidos y pasar al torrente sanguíneo (Hernández-Ledesma et al., 2011) .

Entre todos, el mecanismo de actuación más estudiado y mejor conocido es el de inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE). Se han identificado numerosos péptidos con alto potencial inhibidor de ACE in vitro derivados de proteínas lácteas (Pihlanto-Leppälä, 2000a) (Tavares et al., 2011) (Hernández-Ledesma et al., 2008; Hirota et al., 2007) (El-Salam and El-Shibiny, 2013), carne (Katayama et al., 2008) (Jang et al., 2008) (Bhat et al.,



2015a), proteínas de pescado (Lee and Hur, 2017) , algas (Harnedy and Fitzgerald, 2011) (Vercruyssen et al., 2005), invertebrados marinos (Lee et al., 2012). Ha quedado patente que la fuente de proteína empleada en la hidrólisis, el tipo de proteasa, las condiciones de operación, temperatura y pH, y el grado de hidrólisis alcanzado ejercen gran influencia en la capacidad antihipertensiva final. Se ha demostrado que las serinoproteasas, subtilisina y tripsina, son enzimas eficaces para la obtención de péptidos antihipertensivos (Hernández-Ledesma et al., 2011) (Power et al., 2013).

En cuanto a la correlación entre estructura y actividad, de los estudios realizados, se puede concluir que los péptidos con mayor capacidad inhibidora de ACE son, por lo general, de cadena corta, entre 12 a 2 aminoácidos, con valores de  $IC_{50}$  en la región  $\mu M$ . Ambos dominios de ACE (dominios C y N) contienen la secuencia His-Glu-XX-His en su centro activo, por lo que se encuentran dentro de la hendidura de los dos dominios, y podrían ser inaccesibles a polipéptidos grandes, lo que explicaría la mayor efectividad de péptidos pequeños. Residuos hidrofóbicos, aromáticos o ramificados, en el C-terminal del péptido parecen potenciar su actividad. Tyr, Phe y Trp están presentes en muchos de los inhibidores más potentes (Norris and J., 2013). La presencia de Pro en una o más posiciones, así como la carga positiva en las cadenas laterales de Arg y Lys parecen también potenciar la actividad (Ondetti et al., 1977) (Cheung et al., 1980). A partir de una base de datos de inhibidores de ACE, se han llevado a cabo estudios mediante modelización fisicoquímica QSAR (Quantitative structure-activity relationship) basados en la relación

entre la estructura química de los ligandos y los receptores, y la actividad biológica. Variables fisicoquímicas tales como propiedades estéricas, hidrofobicidad, propiedades electrónicas, masa molecular y forma son utilizadas para correlacionar cuantitativamente la estructura química del ligando con la bioactividad (Pripp et al., 2005). El modelo para dipéptidos ha tenido un poder predictivo de 71.1% sugiriendo la mayor bioactividad de aminoácidos con cadenas laterales voluminosas e hidrófobas, mientras que con el modelo para tripéptidos se ha obtenido un valor predictivo del 43.4% sugiriendo en este caso que los residuos aromáticos en C-terminal, los residuos cargados positivamente en la posición 2 y los residuos hidrofóbicos en el extremo amino potencian la actividad (Wu et al., 2006).

Cabe destacar que dos de los péptidos inhibidores más potentes que se han identificado son los tripéptidos Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro derivados de caseínas, con IC<sub>50</sub> de 9 y 5  $\mu$ M respectivamente (Nakamura et al., 1995) (Hirota et al., 2007).

Por otro lado, si estos biopéptidos van a formar parte de alimentos funcionales y se van a administrar vía oral deben resistir el ataque de las enzimas gástricas y llegar intactos al órgano diana. Para ello se realizan ensayos de digestión simulada utilizando pepsina y Pancreatina® (Vermeirssen et al., 2004) (Miguel et al., 2006). Algunas estructuras, por su secuencia de aminoácidos, son resistentes a la digestión, como los péptidos conteniendo Pro, hidroxipro o péptidos glicosilados (Daniel, 2004). Además, se puede impedir o amortiguar los efectos de la digestión mediante técnicas de encapsulación. Una vez que los péptidos lleguen al intestino deben ser absorbidos por la

mucosa intestinal. En este sentido, se ha comprobado que algunos aminoácidos formados durante la digestión inhiben a las dipeptidasas y aminopeptidasas localizadas en el borde del cepillo. Además se ha puesto de manifiesto que la alta concentración de péptidos presentes excedería a la capacidad máxima de hidrólisis y absorción, y por tanto, hay mecanismos de transporte seguros para dipéptidos y tripéptidos (Daniel, 2004). Varios estudios in vivo, en animales y humanos, han demostrado la presencia de Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro y de otros biopéptidos de mayor longitud de cadena en el sistema circulatorio después de la administración oral, lo que ratifica su resistencia a la degradación gastrointestinal y su absorción intacta a través del borde del cepillo (Vanplaterink et al., 2006) (Foltz et al., 2007) (Ohsawa et al., 2008).

Para algunos péptidos con alta capacidad inhibidora de ACE, derivados de proteínas lácteas o de pescado se han llevado a cabo ensayos clínicos en animales de experimentación y en humanos con la finalidad de cuantificar sus efectos sobre la regulación de la presión arterial (Kawasaki et al., 2000) (Fujita et al., 2001) (Nakamura et al., 2009) (Jäkälä et al., 2009) (Kurosawa et al., 2011). En los ensayos en animales ha habido diversidad en la respuesta según la fuente de proteína, el animal utilizado, la dosis requerida para una disminución significativa de la presión arterial y duración de la administración (Norris and J., 2013). Los ensayos en humanos, se han llevado a cabo principalmente con Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro mostrando reducciones significativas (Boelsma and Kloek, 2009) (Nakamura et al., 2009)

(Kurosawa et al., 2011) aunque por el modelo de ensayo realizado los resultados obtenidos no son comparables.

Es interesante resaltar, que si bien los péptidos derivados de proteínas alimentarias tienen  $IC_{50}$  in vitro más bajos que los péptidos sintéticos como captopril, rango  $\mu M$  vs nM, en la mayoría de los ensayos in vivo exhiben efectos hipotensores más altos que los que cabría esperar por su valor in vitro. Algunos investigadores han sugerido que esto puede ser debido a una mayor selectividad de los péptidos derivados de proteínas alimentarias, a que actúen por varios mecanismos y a una eliminación del organismo más lenta que en el caso de los péptidos sintéticos (Fujita and Yoshikawa, 1999)

Por otro lado, se dispone de pocos estudios técnicos que analicen la producción de estos péptidos bioactivos a escala industrial, su inclusión en matrices y efecto del almacenamiento prolongado en la bioactividad (Norris and J., 2013). Se ha investigado la obtención de dos péptidos, de 5 y 7 aminoácidos, derivados de la caseína, su incorporación a yogur y su estabilidad durante el almacenamiento a 4°C durante 1 mes (Contreras et al., 2011).

Nuestro grupo ha trabajado en la producción de péptidos inhibidores de ACE derivados de proteínas del lactosuero de leche de cabra y descartes de pesca, con la finalidad adicional de revalorizar estos subproductos (Espejo-Carpio et al., 2013a) (Espejo-Carpio et al., 2014a) (García-Moreno et al., 2017) (Espejo-Carpio et al., 2018). Se han identificado algunos péptidos con valores de  $IC_{50}$  en el rango  $\mu M$  (Espejo-Carpio et al., 2013b) (García-Moreno et al., 2015). Se ha

comprobado su resistencia a la digestión mediante ensayos de digestión simulada (Espejo-Carpio et al., 2016). Se han estabilizado mediante secado por atomización (Espejo-Carpio et al., 2014b). Se ha analizado el efecto de su inclusión en sopas de pescado o zumos de frutas, su resistencia a diversos tratamientos de procesado usuales en la industria alimentaria y su almacenamiento prolongado a 4°C.

Realmente, la comercialización generalizada de productos que contengan péptidos reguladores de la presión arterial, depende fundamentalmente de contar con un mayor número de ensayos clínicos en animales y humanos que evidencien de forma clara y precisa su efectividad y de las exigencias de la legislación de cada país para permitir a las empresas productoras la declaración de propiedades saludables en sus productos. En Japón se comercializa Ameal-S® fabricado por la empresa Calpis Co. Ltd., es una leche agria fermentada que contiene Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro., y Casein DP Peptio®, un refresco fabricado por Kanebo Co. Ltd. que contiene el péptido antihipertensivo Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Phe ( $\alpha$ 1-caseína f23-34) (Norris and J., 2013).

### *Péptidos antioxidantes*

Otra de las actividades biológicas de las que se tiene contrastada evidencia científica es la capacidad antioxidante de ciertos péptidos derivados de proteínas alimentarias. Los compuestos antioxidantes pueden inhibir la oxidación mediante distintos mecanismos, como la captación de radicales libres o la quelación de iones metálicos (p. ej. Fe<sup>2+</sup>). Los radicales libres son capaces de inducir o participar en la propagación de reacciones en cadena que acaban atacando

estructuras como las membranas lipídicas, diversas proteínas o enzimas y el propio ADN. Estos daños acumulativos pueden degenerar en diversas enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas o inflamatorias (Butterfield et al., 2002). En el procesado de alimentos, el deterioro de muchos productos suele estar asociado a reacciones de oxidación lipídica, responsables de la aparición de olores y sabores indeseables debido a la formación de peróxidos y otros compuestos secundarios. Los péptidos antioxidantes, además de inhibir o retardar la oxidación lipídica en alimentos, podrían prevenir la oxidación a nivel fisiológico (Hajieva and Behl, 2006). Debido a los potenciales efectos dañinos de los antioxidantes sintéticos (Ito et al., 1985), existe un gran interés en la búsqueda de antioxidantes naturales que no presenten efectos secundarios. Numerosos péptidos derivados de proteínas lácteas (Pihlanto-Leppälä, 2000b) (Phelan et al., 2009), soja (Singh et al., 2014), gluten de trigo (Zhu et al., 2006), huevo (Bhat et al., 2015b), patata (Wang and Xiong, 2005), especies marinas (Jo et al., 2017) han sido descritos como potentes antioxidantes. Algunos, como los deca péptidos Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile o Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr mostraron capacidad antioxidante mayor que antioxidantes comerciales como el hidroxibutilanisol (BHA) (Hernández-Ledesma et al., 2005) o el  $\alpha$ -tocoferol (Jun et al., 2004).

Nuestro grupo trabaja en la obtención de péptidos derivados de proteínas lácteas, soja y descartes de pesca con propiedades emulsionantes y antioxidantes para ser utilizados en los procesos de

encapsulación de aceites de pescado ricos en ácidos grasos poliinsaturados, omega-3 (García-Moreno et al., 2014) (García-Moreno et al., 2016) (Morales-Medina et al., 2016).

Realmente en los últimos años el mayor esfuerzo investigador se ha centrado en los péptidos con capacidad inhibidora de ACE o actividad antioxidante. En algunas investigaciones se han empleado péptidos con ambas propiedades, llamados péptidos antienvjecimiento. Aunque esta línea de trabajo está en fase inicial, estos estudios han demostrado que estos péptidos son capaces de prolongar la vida y de retardar los cambios degenerativos originados con la edad en modelos animales sencillos, como es el caso del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Zhang et al., 2013) (Kumar et al., 2016) . Otro estudio reciente ha puesto de manifiesto que el péptido Tyr-Val-Glu-Glu-Leu con actividad antioxidante presenta un efecto osteoprotector mayor que el péptido Tyr-Leu-Leu-Phe con capacidad antihipertensiva, ambos derivados de proteínas del lactosuero (Pandey et al., 2018).

Como consecuencia del creciente interés que existe por ejercer un efecto beneficioso sobre la salud mediante la alimentación, la búsqueda de péptidos de proteínas alimentarias relacionados con el control de colesterol, glucemia o inflamación están en el punto de mira de investigadores y tecnólogos, aunque su desarrollo no está en fases tan avanzadas.

### *Péptidos hipocolesterolémicos*

Niveles excesivos de colesterol se relacionan con el aumento de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y obesidad (Bhandari et al., 2019). Por tanto, disponer de alimentos que puedan ayudar a controlar dichos niveles sería muy útil para un amplio sector de la población. Una de las vías por las que se produce la acción anticolesterolémica es la captación de ácidos biliares, de forma que se inhibe su reabsorción a nivel del íleon. Al disminuir la reincorporación de ácidos biliares, se incrementa la tasa de producción de éstos en el hígado y, por tanto, el consumo de colesterol, que se retira de la sangre. De acuerdo con la literatura científica, se han aislado fracciones y compuestos con actividad anticolesterolémica a partir de fibras y proteínas de diversos orígenes, como lactoglobulina de leche bovina, harinas de habichuela pinta y gluten de trigo (Kahlon and Woodruff, 2002) (Nagaoka et al., 2001).

### *Péptidos reguladores del índice glucémico*

Una de las aplicaciones recientes más interesantes es el uso de péptidos derivados de proteínas alimentarias para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Harnedy and FitzGerald, 2013) (Marya et al., 2018). Esta enfermedad, es una de las de mayor crecimiento a nivel mundial, afectando a 415 millones de personas. Para su tratamiento se emplean numerosos fármacos que, además de un elevado gasto, presentan numerosos efectos secundarios. Por ello, los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con propiedades reguladoras del índice glucémico supondrían una gran ayuda para la prevención y la mejora del tratamiento de esta enfermedad. El potencial antidiabético



de estos péptidos puede deberse a distintas acciones, entre las que se encontraría la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa (DPP) IV. Esta enzima es la responsable de la degradación de las hormonas incretínicas (GLP-1 y GIP) que ayudan a regular los niveles de glucosa en sangre tras la ingesta de alimentos. Por tanto la inhibición de esta enzima incrementaría los niveles en circulación de las hormonas favoreciendo el control glucémico. Por otro lado, péptidos que inhiban a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa o  $\alpha$ -amilasa e impidan así la digestión de los hidratos de carbono de cadena larga, pueden ser considerados péptidos reguladores de glucosa en sangre. Las secuencias Ile-Asx-Tyr-Trp (Sánchez and Vázquez, 2017) y Lys-Leu-Pro-Gly-Phe (Patil et al., 2015) han sido descritas como péptidos hipoglucémicos. En nuestro grupo se trabaja en la obtención y purificación de péptidos inhibidores de la enzima DPP IV a partir de diversas fuentes de proteínas vegetales y de insectos.

### *Péptidos antiinflamatorios*

Especial atención merecen también los péptidos con efecto antiinflamatorio o capacidad inmunomoduladora (Chalamaiah et al., 2018). Aunque el conocimiento del que se dispone es aún muy primario, y no se conocen detalladamente sus mecanismos de acción, las potenciales aplicaciones de estos hidrolizados en alimentos funcionales para personas con enfermedades inflamatorias crónicas hacen que sean una de las líneas de obtención de biopéptidos más prometedoras. La inflamación es una respuesta compleja e inespecífica del sistema inmune que interviene en numerosas patologías tales como enfermedades cardiovasculares, pulmonares,

gastrointestinales, cáncer, obesidad o artritis. Los estudios disponibles de péptidos antiinflamatorios hacen referencia a diversas vías de actuación. Por un lado a la modulación de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) responsable de la hidrólisis en posición 2 de los fosfolípidos y la obtención de ácidos grasos libres, especialmente del ácido araquidónico (AA) por su implicación mediante la enzima ciclooxigenasa (COX) en la producción de prostaglandinas, involucradas en la vasodilatación provocada en los procesos inflamatorios (Daddaoua et al., 2006; Millán-Linares et al., 2014). Otros estudios evidencian la actuación de estos biopéptidos en base a la inhibición de la expresión de proteínas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) o la interleukina 1beta (IL-1beta), la potenciación de expresión de proteínas antiinflamatorias como la citoquina IL10, o a la modulación de factores de transcripción, quinasas (NF-kB and MAPK) y/o a compuestos del citoplasma (Cicero et al., 2017). Por otro lado, la inhibición de ACE podría también estar relacionada con un efecto antiinflamatorio. Esto se debe a que la angiotensina II, además de ejercer un efecto vasoconstrictor, puede activar la cascada inflamatoria induciendo la inflamación vascular y desarrollando aterosclerosis. Por tanto, la inhibición de ACE originaría una reducción en la generación de angiotensina II, lo que supone una estrategia para reducir la inflamación asociada a ella (Lin et al., 2017). Péptidos antiinflamatorios se han obtenido de la clara del huevo (Mine et al., 2010) y especies marinas como microalgas y esponjas (Kim and Kim, 2013). Las secuencias Val-His, Leu-Ala-Asn, Ala-Leu y Leu-Ala derivadas de la hidrólisis

enzimática de proteína de asta de ciervo han resultado ser potentes antiinflamatorios (Zhao et al., 2016)

---

Este discurso llega a su fin, para terminar quisiera reiterar que los humanos hemos evolucionado como omnívoros oportunistas, es nuestra herencia biológica de millones de años. Los humanos hemos mirado a nuestro alrededor siempre con ojos observadores, hemos destacado por nuestro intelecto, por querer comprender nuestro entorno, por nuestra inquietud de saber, nuestra capacidad de crear conocimiento y nuestro ingenio para aplicarlo, somos transformadores natos. Los humanos hemos hecho de nuestro alimento nuestro sustento, a veces nuestra medicina, nuestra mejor manera de socializar y relacionarnos, hemos hecho ciencia, hemos hecho tecnología, hemos hecho diseño, hemos hecho arte... o ¿cómo le llamamos a esa capacidad de transformación de simples materias primas en productos que son una auténtica sinfonía de sabores, aromas, texturas y sensaciones?

Ya tan solo me queda que me permitan pedir un deseo y recordar a tantas personas que han hecho posible que hoy esté yo aquí.

Dice un proverbio africano que "si las mujeres bajaran los brazos el cielo se caería", ojalá pronto se entienda que además tienen que "alzar su voz"

Y no podría terminar sin dar las gracias:

A los profesores que me enseñaron y marcaron el camino, en especial a Dña. Encarnita Morales, mi profesora de 8º de EGB, con ella aprendí la tabla periódica; a D. Aurelio Peñalver, el mejor profesor de matemáticas que he tenido, él me animó a estudiar Química; a D. Fernando Camacho y D. Pedro González-Tello, mis directores de Tesis y mis maestros.

A mi grupo de investigación, por su trabajo y dedicación.

A mis amigos, en especial a Nieves por estar siempre ahí.

A mi familia, a mis abuelos, a mis tíos, a mis hermanos, todos han puesto su granito de arena. A la memoria de mi padre y a la falta ya de memoria de mi madre, por su infinita generosidad y continuo sacrificio para darlo siempre todo por sus hijos.

Y de una forma muy especial a Vika, sencillamente porque es pura luz, es amor, es cariño, afecto, alegría, es ilusión, es capaz de sacar lo mejor de mí. A ti Vika porque "*nunca sabrás sumar lo que te quiero*".

## REFERENCIAS

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins* (London: Elsevier Applied Science Publishers).

Adler-Nissen, J., Eriksen, S., and Olsen, H.S. (1983). Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* 32, 411–423.

Adrio, J., and Demain, A. (2014). *Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes*. *Biomolecules* 4, 117–139.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2019). *Enzimas alimentarias* (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social).

Aiello, L.C., and Wheeler, P. (1995). The Expensive-Tissue Hypothesis: The Brain and the Digestive System in Human and Primate Evolution. *Curr. Anthropol.* 36, 199–221.

Al-Manhel, A.J.A. (2018). Application of Microbial Enzymes in Dairy Products: A Review. *Basrah J. Agric. Sci.* 31, 20–30.

Alting, A.C., Fred van de Velde, Kanning, M.W., Burgering, M., Mulleners, L., Sein, A., and Buwalda, P. (2009). Improved creaminess of low-fat yoghurt: The impact of amyloamylase-treated starch domains. *Food Hydrocoll.* 23, 980–987.

Aragón, J. (2009). Un recorrido por el nacimiento de la enzimología y los orígenes de la bioquímica actual. *Encuentros Multidiscip.* 11, 15–24.

Armstrong, E.F. (1930). *Enzymes*. By J.B.S. Haldane, M.A. *Monographs on Biochemistry*. Edited by R.H.A. Plimmer, D.Sc., and Sir F. G. Hopkins, M.A., M.B., D.Sc., F.R.S. Pp. vii+235. London: Longmans, Green & Co., 1930. Price 14s. *J. Soc. Chem. Ind.* 49, 919–920.

Arsuaga, J.L. (2003). *Los aborígenes: la alimentación en la evolución humana* (Barcelona: RBA).

Bailey, D.H., and Geary, D.C. (2009). Hominid Brain Evolution: Testing Climatic, Ecological, and Social Competition Models. *Hum. Nat.* 20, 67–79.

Barnard, G.C., Henderson, G.E., Srinivasan, S., and Gerngross, T.U. (2004). High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein Expr. Purif.* 38, 264–271.

Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., and Kumar, V. (2019). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *Int. J. Pept. Res. Ther.*

Bhat, Z.F., Kumar, S., and Bhat, H.F. (2015a). Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5377–5392.

Bhat, Z.F., Kumar, S., and Bhat, H.F. (2015b). Bioactive peptides from egg: a review. *Nutr. Food Sci.* 45, 190–212.

Biwer, A., Antranikian, G., and Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 609–617.

Boelsma, E., and Kloek, J. (2009). Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *Br. J. Nutr.* 101, 776–786.

Butterfield, D., Castegna, A., Pocernich, C., Drake, J., Scapagnini, G., and Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 13, 444.

Byrne, R.W., and Bates, L.A. (2007). Sociality, Evolution and Cognition. *Curr. Biol.* 17, R714–R723.

Calvo, M. (2015). Informe relativo a los organismos genéticamente modificados (Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria).

Camacho, F., González-Tello, P., Páez-Dueñas, M.-P., Guadix, E.-M., and Guadix, A. (2001). Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *J. Dairy Res.* 68, 251–265.

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods – a world perspective. *Food Res. Int.* 27, 253–257.

de Carvalho, C.C.C.R. (2011). Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* 29, 75–83.

Chalamaiah, M., Yu, W., and Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* 245, 205–222.

Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., and Cushman, D.W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 255, 401–407.

Chiang, W.-D., Shih, C.-J., and Chu, Y.-H. (1999). Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.* 65, 189–194.

Cicero, A.F.G., Fogacci, F., and Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1378–1394.

Contreras, M. del M., Sevilla, M.A., Monroy-Ruiz, J., Amigo, L., Gómez-Sala, B., Molina, E., Ramos, M., and Recio, I. (2011). Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *Int. Dairy J.* 21, 470–476.

Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., Sánchez De Medina, F., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., Boza, J.J., and Martínez-Augustin, O. (2006). Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* 136, 672–676.

Damodaran, S., and Paraf, A. (1997). *Food proteins and their applications* (New York: Marcel Dekker).

Daniel, H. (2004). Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361–384.

Demain, A.L., and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27, 297–306.

Don, L.S.B., Pilosof, A.M.R., and Bartholomai, G.B. (1991). Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *68*, 102–105.

Douglas, G.L., and Klaenhammer, T.R. (2010). Genomic Evolution of Domesticated Microorganisms. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* *1*, 397–414.

El-Salam, M.H.A., and El-Shibiny, S. (2013). Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products. *Food Rev. Int.* *29*, 1–23.

Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2013a). Optimisation of the hydrolysis of goat milk protein for the production of ACE-inhibitory peptides. *J. Dairy Res.* *80*, 214–222.

Espejo-Carpio, F.J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E.M., and Otte, J. (2013b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *Int. Dairy J.* *32*, 175–183.

Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Del Carmen Almécija, M., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2014a). Production of goat milk protein hydrolysate enriched in ACE-inhibitory peptides by ultrafiltration. *J. Dairy Res.* *81*, 385–393.

Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2014b). Spray Drying of Goat Milk Protein Hydrolysates with Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Bioprocess Technol.* *7*, 2388–2396.

Espejo-Carpio, F.J., García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Morales-Medina, R., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2016). Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. *Int. Dairy J.* *54*, 21–28.

Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2018). Artificial neuronal networks (ANN) to model the hydrolysis of goat milk protein by subtilisin and trypsin. *J. Dairy Res.* *85*, 339–346.

Fehmerling, G. (1973). Separation of edible tissue from edible flesh of marine creatures.



Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T.M.M.G., and Kloek, J. (2007). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage Are Absorbed Intact into the Circulation. *J. Nutr.* 137, 953–958.

Food and Drug Administration (2019). Enzyme Preparations Used in Food (United States Government).

Franco, L. (2007). Enzimas: qué son y para qué sirven. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat* 101, 399–417.

Friedmann, H.C. (1981). Enzymes (Stroudsburg, Pa: Hutchinson Ross Pub. Co).

Fruton, J.S. (1999). Proteins, enzymes, genes: the interplay of chemistry and biology (New Haven, CT: Yale University Press).

Fujita, H., and Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 44, 123–127.

Fujita, H., Yamagami, T., and Ohshima, K. (2001). Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr. Res.* 21, 1149–1158.

García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N.M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Res. Int.* 65, 469–476.

García-Moreno, P.J., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2015). Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards. *J. Funct. Foods* 18, 95–105.

García-Moreno, P.J., Guadix, A., Guadix, E.M., and Jacobsen, C. (2016). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chem.* 203, 124–135.

García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Ruiz-Quesada, C., Pérez-Morilla, A.I., Martínez-Agustín, O., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2017). Functional, bioactive and antigenicity

properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 97, 299–308.

Gibbons, J.G., and Rinker, D.C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 1–8.

Gómez, B., Munekata, P.E.S., Gavahian, M., Barba, F.J., Martí-Quijal, F.J., Bolumar, T., Campagnol, P.C.B., Tomasevic, I., and Lorenzo, J.M. (2019). Application of pulsed electric fields in meat and fish processing industries: An overview. *Food Res. Int.* 123, 95–105.

Grassin, C., and Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases in beverages. In *Progress in Biotechnology*, (Elsevier), pp. 453–462.

Guadix, A., Camacho, F., and Guadix, E.M. (2006). Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *J. Food Eng.* 72, 398–405.

Guadix, A., Guadix, E.M., and Prieto, C.A. (2008). Recycle of enzymes in the production of food protein hydrolysates. In *Recycling: New Research*, pp. 125–150.

Guang, C., and Phillips, R.D. (2009). Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5113–5120.

Guerra-Doce, E. (2015). Psychoactive Substances in Prehistoric Times: Examining the Archaeological Evidence. *Time Mind* 8, 91–112.

Hajieva, P., and Behl, C. (2006). Antioxidants as a potential therapy against age-related neurodegenerative diseases: Amyloid beta toxicity and Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 12, 699–704.

Harnedy, P.A., and Fitzgerald, R.J. (2011). Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *J. Phycol.* 47, 218–232.

Harnedy, P.A., and FitzGerald, R.J. (2013). In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates. *J. Appl. Phycol.* 25, 1793–1803.

Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* *18*, 163–169.

Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S.D., and Schwab, H. (1997). High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree *Hevea brasiliensis* in Microbial Hosts. *Protein Expr. Purif.* *11*, 61–71.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 588–593.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., and Amigo, L. (2008).  $\beta$ -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids* *35*, 257–265.

Hernández-Ledesma, B., Del, M.C., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* *165*, 23–35.

Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., and Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* *38*, 82–100.

Hinz, K., Huppertz, T., Kulozik, U., and Kelly, A.L. (2007). Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *Int. Dairy J.* *17*, 289–293.

Hirota, T., Ohki, K., Kawagishi, R., Kajimoto, Y., Mizuno, S., Nakamura, Y., and Kitakaze, M. (2007). Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides val-pro-pro and ile-pro-pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: Contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.* *30*, 489–496.

Ishida, Y., Shibata, Y., Fukuhara, I., Yano, Y., Takehara, I., and Kaneko, K. (2011). Effect of an excess intake of casein hydrolysate containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in subjects with normal blood

pressure, high-normal blood pressure, or mild hypertension. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *75*, 427–433.

Ito, N., Fukushima, S., and Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by bha, bht, and other antioxidants. *Crit. Rev. Toxicol.* *15*, 109–150.

Jäkälä, P., Hakala, A., Turpeinen, A.M., Korpela, R., and Vapaatalo, H. (2009). Casein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro attenuate the development of hypertension and improve endothelial function in salt-loaded Goto-Kakizaki rats. *J. Funct. Foods* *1*, 366–374.

Jang, A., Jo, C., Kang, K.-S., and Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chem.* *107*, 327–336.

Jo, C., Khan, F.F., Khan, M.I., and Iqbal, J. (2017). Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions. *Food Rev. Int.* *33*, 44–61.

Johnston, C.I. (1992). Renin – angiotensin system: A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J. Hypertens.* *10*, S13–S26.

Jun, S.-Y., Park, P.-J., Jung, W.-K., and Kim, S.-K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.* *219*, 20–26.

Kahlon, T.S., and Woodruff, C.L. (2002). In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. *Food Chem.* *79*, 425–429.

Kailasapathy, K., and Lam, S.H. (2005). Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.* *15*, 929–939.

Kaper, T., Talik, B., Ettema, T.J., Bos, H., van der Maarel, M.J.E.C., and Dijkhuizen, L. (2005). Amylomaltase of *Pyrobaculum aerophilum* IM2 Produces Thermoreversible Starch Gels. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 5098–5106.

Katayama, K., Anggraeni, H.E., Mori, T., Ahhmed, A.M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakayama, T., Maruyama, M., and Muguruma, M. (2008). Porcine Skeletal Muscle Troponin Is a Good Source of Peptides with Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity and Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* 56, 355–360.

Kawasaki, T., Seki, E., Osajima, K., Yoshida, M., Asada, K., Matsui, T., and Osajima, Y. (2000). Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertens.* 14, 519–523.

Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Whelton, P.K., and He, J. (2004). Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J. Hypertens.* 22, 11–19.

Kim, H.-J., and Taub, I.A. (1991). Specific degradation of myosin in meat by bromelain. *Food Chem.* 40, 337–343.

Kim, J.-A., and Kim, S.-K. (2013). Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, 177–182.

Kirkland, E.B., Heincelman, M., Bishu, K.G., Schumann, S.O., Schreiner, A., Axon, R.N., Mauldin, P.D., and Moran, W.P. (2018). Trends in Healthcare Expenditures Among US Adults With Hypertension: National Estimates, 2003–2014. *J. Am. Heart Assoc.* 7.

Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241–246.

Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960.

Kornberg, A. (1989). For the love of enzymes: the odyssey of a biochemist (Cambridge, Mass: Harvard University Press).

Koshland, D.E., Némethy, G., and Filmer, D. (1966). Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits \*. *Biochemistry* 5, 365–385.

- Kumar, S., Dietrich, N., and Kornfeld, K. (2016). Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span. *PLoS Genet.* 12.
- Kurosawa, M.T., Nakamura, Y., Yamamoto, N., Yamada, K., and Iketani, T. (2011). Effects of Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on Nondipper Patients: A Preliminary Study. *J. Med. Food* 14, 538–542.
- Law, B.A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technology. *Int. Dairy J.* 11, 383–398.
- Law, B.A., and John, P. (1981). Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation of the electrochemical proton gradient in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 10, 67–70.
- Law, B.A., and Wigmore, A. (1982). Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. *J. Dairy Res.* 49, 137–146.
- Law, B.A., and Wigmore, A.S. (1983). Accelerated ripening of Cheddar cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from starter streptococci. *J. Dairy Res.* 50, 519–525.
- Lee, S.Y., and Hur, S.J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chem.* 228, 506–517.
- Lee, H.-S., Auh, J.-H., Yoon, H.-G., Kim, M.-J., Park, J.-H., Hong, S.-S., Kang, M.-H., Kim, T.-J., Moon, T.-W., Kim, J.-W., et al. (2002). Cooperative Action of  $\alpha$ -Glucanotransferase and Maltogenic Amylase for an Improved Process of Isomaltooligosaccharide (IMO) Production. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2812–2817.
- Lee, J.K., Jeon, J.-K., Kim, S.-K., and Byun, H.-G. (2012). Characterization of Bioactive Peptides Obtained from Marine Invertebrates. In *Advances in Food and Nutrition Research*, (Elsevier), pp. 47–72.
- Leonard, W.R. (2002). Food for Thought. *Sci. Am.* 287, 106–115.
- Li, H., and Aluko, R.E. (2010). Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11471–11476.

Lin, Q., Liao, W., Bai, J., Wu, W., and Wu, J. (2017). Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells. *J. Funct. Foods* 34, 248–253.

Lopez-Camacho, C., Salgado, J., Lequerica, J.L., Madarro, A., Ballestar, E., Franco, L., and Polaina, J. (1996). Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa*  $\beta$ -glucosidase A. *Biochem. J.* 314, 833–838.

Lugo, I. (2015). Alimentación, cultura y tecnología: diseño global de estrategias. *Temas Disseny* 31, 23–31.

van der Maarel, M.J.E.C., Capron, I., Euverink, G.-J.W., Bos, H.Th., Kaper, T., Binnema, D.J., and Steeneken, P.A.M. (2005). A Novel Thermoreversible Gelling Product Made by Enzymatic Modification of Starch. *Starch - Stärke* 57, 465–472.

Maes, W., Van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J.M., Schrezenmeir, J., Van Oostveldt, P., and Huyghebaert, A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regul. Pept.* 118, 105–109.

Mahmoud, M.I., Malone, W.T., and Cordle, C.T. (1992). Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *J. Food Sci.* 57, 1223–1229.

Marín-Suárez, M., Morales-Medina, R., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2017). A Simple Enzymatic Process to Produce Functional Lipids From Vegetable and Fish Oil Mixtures. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119.

Marya, Khan, H., Nabavi, S.M., and Habtemariam, S. (2018). Anti-diabetic potential of peptides: Future prospects as therapeutic agents. *Life Sci.* 193, 153–158.

Mateos, A., and Rodríguez, J. (2010). *La dieta que nos hizo humanos* (Junta de Castilla y León).

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nunez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C. -s., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 17593–17598.

- Mietsch, F., Fehér, J., and Halász, A. (1989). Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins. *Nahr.* 33, 9–15.
- Miguel, M., Aleixandre, M.A., Ramos, M., and López-Fandiño, R. (2006). Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 726–731.
- Millán-Linares, M. del C., Yust, M. del M., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F., and Pedroche, J. (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem.* 151, 141–147.
- Mine, Y., Li-Chan, E., and Jiang, B. (2010). Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals (Ames, Iowa: Wiley-Blackwell).
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* 47, 171–182.
- Monod, J., Changeux, J.-P., and Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6, 306–329.
- del Moral, S., Ramírez, L., and García, M. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Rev. Iberoam. Cienc.* 2, 87–102.
- Morales-de la Peña, M., Welti-Chanes, J., and Martín-Belloso, O. (2019). Novel technologies to improve food safety and quality. *Curr. Opin. Food Sci.* 30, 1–7.
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A.M., Guadix, E.M., and Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chem.* 194, 1208–1216.
- Morales-Medina, R., Munio, M., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2017). Development of an up-grading process to produce MLM structured lipids from sardine discards. *Food Chem.* 228, 634–642.



Morales-Medina, R., Munio, M., Guadix, A., Guadix, E.M., and Camacho, F. (2018). A lumped model of the lipase catalyzed hydrolysis of sardine oil to maximize polyunsaturated fatty acids content in acylglycerols. *Food Chem.* 240, 286–294.

Motoki, M., and Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 204–210.

Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., and Kuwata, T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk $\beta$ -lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 11–17.

Nakamura, T., Mizutani, J., Sasaki, K., Yamamoto, N., and Takazawa, K. (2009). Beneficial Potential of Casein Hydrolysate Containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on Central Blood Pressure and Hemodynamic Index: A Preliminary Study. *J. Med. Food* 12, 1221–1226.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. (1995). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *J. Dairy Sci.* 78, 777–783.

Norris, R., and J., R. (2013). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. In *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, B. Hernandez-Ledesma, ed. (InTech), p.

Nurminen, M.-L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H., and Vapaatalo, H. (2000).  $\alpha$ -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 66, 1535–1543.

Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., and Shimizu, M. (2008). Producibility and Digestibility of Antihypertensive  $\beta$ -Casein Tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the Gastrointestinal Tract: Analyses Using an *in Vitro* Model of Mammalian Gastrointestinal Digestion. *J. Agric. Food Chem.* 56, 854–858.

- Okitsu, M., Morita, A., Kakitani, M., Okada, M., and Yokogoshi, H. (1995). Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 325–326.
- Ondetti, M., Rubin, B., and Cushman, D. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196, 441–444.
- Otte, J., Lomholt, S.B., Ipsen, R., Stapelfeldt, H., Bukrinsky, J.T., and Qvist, K.B. (1997). Aggregate Formation during Hydrolysis of  $\beta$ -Lactoglobulin with a Glu and Asp Specific Protease from *Bacillus licheniformis*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4889–4896.
- Ozer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A., and Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *Int. Dairy J.* 17, 199–207.
- Pandey, M., Kapila, S., Kapila, R., Trivedi, R., and Karvande, A. (2018). Evaluation of the osteoprotective potential of whey derived-antioxidative (YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF) bioactive peptides in ovariectomised rats. *Food Funct.* 9, 4791–4801.
- Pasteur, L. (1860). *Mémoire sur la fermentation alcoolique* (Victor Masson).
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S.K., and Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *Eur. J. Nutr.* 54, 863–880.
- Pérez-Gálvez, R., Almécija, M.C., Espejo, F.J., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2011). Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. *Biochem. Eng. J.* 53, 305–310.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J., and O'Brien, N.M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19, 643–654.
- Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Functionality and production. *Agro Food Ind. Hi-Tech* 17, 24–26.

Pihlanto-Leppälä, A. (2000a). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* *11*, 347–356.

Pihlanto-Leppälä, A. (2000b). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins. *Trends Food Sci. Technol.* *11*, 347–356.

Power, O., Jakeman, P., and Fitzgerald, R.J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids* *44*, 797–820.

Prieto, C.A., Guadix, A., González-Tello, P., and Guadix, E.M. (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *J. Food Eng.* *78*, 257–265.

Prieto, C.A., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2010). Optimal operation of a protein hydrolysis reactor with enzyme recycle. *J. Food Eng.* *97*, 24–30.

Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sørhaug, T., and Ardö, Y. (2005). Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. *Trends Food Sci. Technol.* *16*, 484–494.

Radu, C.-D., Parteni, O., and Ochiuz, L. (2016). Applications of cyclodextrins in medical textiles – review. *J. Controlled Release* *224*, 146–157.

Saha, B.C., and Hayashi, K. (2001). Debitting of protein hydrolyzates. *Biotechnol. Adv.* *19*, 355–370.

Sánchez, A., and Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Qual. Saf.* *1*, 29–46.

Sicard, D., and Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.* *334*, 229–236.

Singh, B.K. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trends Biotechnol.* *28*, 111–116.

- Singh, B.P., Vij, S., and Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54, 171–179.
- Soetaert, W., and Vandamme, E.J. (2010). *Industrial biotechnology: sustainable growth and economic success* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Sols, A. (1981). Multimodulation of Enzyme Activity. In *Current Topics in Cellular Regulation*, (Elsevier), pp. 77–101.
- Somogyi, G., Posta, J., Buris, L., and Varga, M. (2006). Cyclodextrin (CD) complexes of cholesterol--their potential use in reducing dietary cholesterol intake. *Pharm.* 61, 154–156.
- Stratakos, A.Ch., Inguglia, E.S., Linton, M., Tollerton, J., Murphy, L., Corcionivoschi, N., Koidis, A., and Tiwari, B.K. (2019). Effect of high pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52, 325–333.
- Tamang, J.P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., and Chae, S.-W. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* 7.
- Tavares, T., Contreras, M.D.M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., and Malcata, F.X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides* 32, 1013–1019.
- Tello, P.G., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M.P., and Guadix, E.M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 529–532.
- Tucker, G.A., and Woods, L.F.J. (1995). *Enzymes in Food Processing* (Boston, MA: Springer US).
- Udenigwe, C.C., Lin, Y.-S., Hou, W.-C., and Aluko, R.E. (2009). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Funct. Foods* 1, 199–207.
- Vanplaterink, C., Janssen, H., Horsten, R., and Haverkamp, J. (2006). Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using

high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 830, 151–157.

Venter, J.C. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.

Vercruyse, L., Van Camp, J., and Smagghe, G. (2005). ACE Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Animal Muscle Protein: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8106–8115.

Vermeirssen, V., Camp, J.V., and Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr.* 92, 357–366.

Wang, L.L., and Xiong, Y.L. (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9186–9192.

Werten, M.W.T., van den Bosch, T.J., Wind, R.D., Mooibroek, H., and de Wolf, F.A. (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15, 1087–1096.

Whitehurst, R.J., and van Oort, M. (2009). *Enzymes in Food Technology* (Oxford, UK: Wiley-Blackwell).

Wijsekara, I., and Kim, S.-K. (2010). Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry. *Mar. Drugs* 8, 1080–1093.

Wilks, H., Hart, K., Feeney, R., Dunn, C., Muirhead, H., Chia, W., Barstow, D., Atkinson, T., Clarke, A., and Holbrook, J. (1988). A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science* 242, 1541–1544.

Wrangham, R.W. (2010). *Catching fire: how cooking made us human* (London: Profile).

Wu, J., Aluko, R.E., and Nakai, S. (2006). Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *J. Agric. Food Chem.* 54, 732–738.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.

Yoshikawa, M. (1994). Casoxin D, an opioid antagonist/ileum-contracting/vasorelaxing peptide derived from human alphas1-casein. pp. 43–48.

Zhang, Y., and Zhang, Y. (2007). Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on the Current State of Knowledge. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 521–542.

Zhang, W., Lv, T., Li, M., Wu, Q., Yang, L., Liu, H., Sun, D., Sun, L., Zhuang, Z., and Wang, D. (2013). Beneficial Effects of Wheat Gluten Hydrolysate to Extend Lifespan and Induce Stress Resistance in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 8.

Zhang, X., Leemhuis, H., and van der Maarel, M.J.E.C. (2019). Synthesis of highly branched  $\alpha$ -glucans with different structures using GH13 and GH57 glycogen branching enzymes. *Carbohydr. Polym.* 216, 231–237.

Zhao, L., Wang, X., Zhang, X.-L., and Xie, Q.-F. (2016). Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus). *J. Food Drug Anal.* 24, 376–384.

Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* 41, 1296–1302.

Zipes, D.P., Libby, P., Bonow, R.O., Mann, D.L., Tomaselli, G.F., and Braunwald, E. (2019). Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine (Philadelphia, PA: Elsevier).



**Contestación al discurso de Ingreso en la Academia de Ciencias  
Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada de la**

**Ilma. Sra. Dña. Emilia Guadix Escobar**

**Ilmo. Sr. D. Francisco Santoyo González**

**Excelentísima Sra. Rectora Magnífica de la Universidad de  
Granada,**

**Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Ciencias  
Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada,**

**Excelentísimos e Ilustrísimos Miembros de la Academia,**

**Señoras y Señores.**

Antes que nada, quisiera comentar que constituye para mí un honor haber recibido y aceptar la propuesta que en nombre de la Academia me hizo el Secretario de la misma en nombre de la Academia para actuar como padrino en este acto de ingreso como Académica de la Profesora Dña. Emilia Guadix Escobar, Catedrática



de Ingeniería Química de esta Universidad. Es, por tanto, un placer poder responder en nombre de la Academia a su Discurso no solo porque sea preceptivo sino porque me otorga la oportunidad de transmitirle una sincera congratulación y de ofrecerle una cordial bienvenida como miembro de la misma.

Aunque los méritos de la nueva Académica han sido ya valorados por los miembros de la Academia, no es solo una obligación sino sobre todo un acto de justicia destacar públicamente las razones que han determinado su entrada en la misma.

En una máxima, Víctor Hugo afirmo que “El éxito no se logra sólo con cualidades especiales. Es sobre todo un trabajo de constancia, de método y de organización”. Este es el caso de nuestra nueva Académica en donde cualidades, esfuerzo y logros se han conjugado de una forma ejemplar. Esta fructífera sinergia de voluntad y trabajo dio ya de forma temprana sus frutos durante el periodo de su formación académica, como lo evidencian los galardones recibidos por su buen hacer y esfuerzo: Premios Extraordinario de Licenciatura en Ciencias Químicas (Especialidad Química Industrial), Premio Extraordinario de Doctorado, estudios ambos realizados en esta Universidad de Granada, y también el premio FESLAC que recibió su tesis Doctoral por parte de la prestigiosa Fundación Lactea.

Con el mencionado currículum académico, su acceso a la carrera docente universitaria se realizó con facilidad y de nuevo con constancia a través de un periplo que, iniciándose ya en el año 1991 durante la realización de su tesis doctoral como becaria FPI, le permitió acceder en un corto periodo de tiempo a la posición de

Profesora Titular de Universidad en el año 1997, después de haber desempeñado dentro de nuestras fronteras los puestos de profesora ayudante, profesora asociada, y también en tierras inglesas el puesto de Honorary Research Assitant en el University College de Londres. Posteriormente, en el año 2012 consiguió por concurso oposición de forma meritoria su actual posición como Catedrática de Universidad.

En todos estos años de dedicación entregada a esa encomiable faceta del quehacer del Profesor Universitario que es la docencia, su labor ha sido amplia y diversa habiendo impartido docencia de grado en diversas titulaciones: Licenciatura en Ciencias Químicas, Especialidad Química Industrial, Licenciatura de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Ingeniero Químico y en el grado de Ingeniería Química; docencia de posgrado en diversos Másteres y Doctorados; y también docencia universitaria no reglada: Programa ocupacional del fondo Social Europeo y docencia en el Centro Mediterráneo de la UGR por mencionar las más sobresalientes. Su valía y excelencia docente ha quedado manifestada entre otros por los siguientes hitos: 1) su rol en dos ocasiones como ponente en el programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe de la Universidad de Naciones Unidas; 2) su actual puesto como Directora Académica del Programa de formación continua de la empresa Abbott en su sede de Granada desde el 2010; y 3) particularmente, su vigente Presidencia del Aula Abbott de la Facultad de Ciencias desde su fundación en el año 2018. El papel jugado por la nueva académica en la creación y puesta en marcha de la que es la primera Cátedra y Aula institucional y de empresa de la Universidad de Granada

ejemplifica a la perfección la máxima de Aristóteles de que “Somos lo que hacemos día a día. De modo que la excelencia no es un acto sino un hábito”. Las Cátedras y Aulas-Universidad-Empresa son instrumentos que sirven para establecer acuerdos de larga duración entre la Universidad y una o varias empresas o instituciones públicas o privadas en uno o varios ámbitos de conocimiento, con el fin de desarrollar actividades de docencia e investigación de interés mutuo. En mi opinión, este tipo de iniciativas colaborativas son absolutamente necesarias en la sociedad actual ya que en ellas todas las partes resultan beneficiadas: La Universidad, porque puede poner a disposición de los alumnos experiencias que le permitan un mayor conocimiento del mundo empresarial, y la empresa, porque se le posibilita una conexión con el mundo de la investigación y del conocimiento de la Universidad.

En lo que respecta a la actividad investigadora de la Profesora Guadix, ésta ha estado vertebrada por su pasión por los procesos enzimáticos y su interconexión con el mundo de la alimentación, desde su visión como ingeniera química que es, tal y como nos ha ilustrado con maestría a través de su magistral discurso. De la apasionada disertación con la que se nos ha deleitado, podemos aseverar la veracidad de Plutarco cuando enunció que «El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende». Este fuego se encendió para nuestra Académica con sus estudios de Tesis Doctoral que versaron sobre “Hidrólisis enzimática de las proteínas del suero láctico”, investigaciones que realizó bajo la dirección de los renombrados investigadores el Profesores Camacho

Rubio, Académico de esta Institución, y el Profesor González Tello. Con posterioridad, este fuego ha sido avivado a través de la ejecución de más de 14 proyectos de investigación, de los que ha sido investigadora responsable en ocho de ellos, y con los logros conseguidos en su dedicada actividad investigadora: avances en el conocimiento que están recogidos en más de 90 artículos, transferencia de conocimiento al sector productivo mediante diversas patentes de invención de su autoría, y participación en contratos de I+D, quince, de especial relevancia con empresas, colaboraciones que la Profesora Guadix ha establecido con el tejido empresarial de nuestro entorno más cercano: las empresas Puleva Biotech y Abbott.

Con su intensa actividad sinérgica entre Universidad y Empresa, la Profesora Guadix ha hecho suya la máxima del Premio Nobel André Gide de que “El porvenir pertenece a los innovadores” y que yo personalmente suscribo pues como dijo Graham Bell “Grandes descubrimientos y mejoras implican invariablemente la cooperación de muchas mentes.” En el mundo en el que vivimos la formación ha de adaptarse a una serie de innegables factores emergentes como son: La globalización, que nos hace enfrentarnos a un mundo donde la competencia no conoce fronteras; las altas tasas de desempleo, fundamentalmente juvenil, con su paralela desaparición del empleo estable, que conduce cada vez más al emprendimiento como salida profesional; y también, la denominada “cuarta revolución industrial” en donde la Innovación tecnológica, la robótica y la inteligencia artificial son causa motriz para la amortización y desaparición de muchos de los empleos tradicionales

en un futuro que se ha iniciado ya. Por estas y otras razones, la Universidad y el mundo empresarial han de ir de la mano. Las empresas tienen que entrar en las aulas y los estudiantes tienen que ir a las empresas. Piedra angular para facilitar este caminar conjunto es la implementación de políticas de estado que apoyen y faciliten esta simbiosis y que actúen como catalizadores para generar una investigación conjunta que beneficie en último término a la sociedad a través de la generación de crecimiento económico y del desarrollo. En mi opinión esto es lo que ha hecho y que estoy seguro seguirá haciendo nuestra nueva Académica, quien no solo ha entendido sino sobre todo llevado a la práctica uno de los axiomas formulados por Hannah Arendt, una de las filósofas más influyentes del siglo XX quien postulo que “Los hombres, aunque han de morir, no nacieron para morir, sino para innovar”.

Pasando ya a su discurso de ingreso, debo comentar que en él se nos ha ilustrado, con la convicción y serenidad que manan del erudito en la materia, sobre un tema de una centralidad innegable como es la importancia de la alimentación en la vida humana. De una forma no solo científica sino también prosaica, nos ha iniciado en el tópico a través de una introducción en la que ha desgranado, de una manera racional y amena, una visión histórica de la evolución de la alimentación y su interconexión con la evolución humana, analizando como la alimentación ha influido en la fisiología y anatomía humana. Seguidamente nos ha introducido en el tema de la fermentación, su descubrimiento, evolución e importancia para desembocar en la importancia de los enzimas y, así poder llegar al tema de las

tecnologías enzimáticas, temática en la que como ya he mencionado Emilia ha dedicado la mayor parte de su esfuerzo investigador. En este apartado nos ha destacado la interconexión entre los procesos enzimáticos, lo que ella denomina “revolución enzimática”, la Medicina y la Nutrición, parcelas de gran interés e importancia de la sociedad actual. Este apartado de su alocución nos ha puesto de manifestado un interés y pasión por la Historia de la Ciencia propia del intelectual que reconoce su importancia.

Con continuidad argumental, se nos ha sumergido seguidamente en el tema de la Ingeniería Bioquímica, disciplina en la que la Profesora Guadix es experta, tal y como lo evidencian la aparición concomitante dentro del repertorio bibliográfico de su discurso de citas bibliográficas de su autoría. Se nos han señalado los grandes retos que presenta la Ingeniería Bioquímica: la elección de disolvente, el rehúso de los enzimas, la inmovilización de enzimas covalente y no covalente, tema por el que siento una gran pasión como químico orgánico, el binomio reactores enzimáticos-ultrafiltración, etc. En este campo, son destacables sus propias contribuciones, principalmente en lo que respecta al uso de reactores de membrana que permiten aplicaciones en continuo y el reciclado de los enzimas. Desde la perspectiva que proporciona su fructífera dualidad entre la Ciencia y la Empresa, se nos han destacado también los sectores en los que los enzimas presentan gran importancia: la industria alimentaria, la industria textil, la industria papelera, la industria farmacéutica y biotecnológica, y también, en un tema de máxima actualidad como es del de la obtención de biocombustibles.

Tras retomar el tema de la importancia del empleo de enzimas en alimentación e indicar la problemática de las distintas legislaciones sobre este tema, la Profesora Guadix ha abordado uno de sus temas preferidos de investigación: el uso de enzimas en la industria láctea y en el procesado de almidones, punto este que entronca con mis intereses científicos particulares. Como científico dedicado a la química de los hidratos de carbono, el uso de enzimas en el procesado de almidones ha estado como telón de fondo en mi actividad investigadora. Una gran parte de mis investigaciones han estado centradas en los polisacáridos cíclicos denominados ciclodextrinas, compuestos de una importancia relevante en nuestros días a las que yo dedique mi discurso de entrada en esta Institución y que han sido también mencionados hoy como compuestos generados a partir de almidón mediante el uso de procesos enzimáticos.

La narrativa de discurso ha confluído finalmente en una de las líneas de investigación que más satisfacciones le ha proporcionado a la Profesora Guadix: las aplicaciones de los procesos enzimáticos a la industria de la alimentación desde el punto de vista de la Química Industrial. En este contexto se nos ha sensibilizado sobre el especial interés que tiene en la actualidad el empleo de proteasas para la obtención de péptidos y biopéptidos, los elementos constituyentes de las proteínas, y de las aplicaciones de los hidrolizados obtenidos como productos de valor añadido por su potencial como agentes antihipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolémicos, antidiabéticos, o antiinflamatorios. Las ideas conceptuales científicas que subyacen son brillantes no solo por la finalidad perseguida, la

solución de problemas sociales reales, sino también por el hecho del empleo como materiales de partida de subproductos proteicos de la industria alimentaria, tales como el lactosuero de leche, descartes de pesca, etc., con lo que se consigue una revalorización de tales subproductos.

En este punto quiero resaltar una de aportaciones científicas más relevantes de la Profesora Guadix a la que ella solo ha dedicado solo un breve comentario, en línea con la sencillez y humildad de su carácter. Se trata del denomina secado por atomización, proceso es de gran importancia en la industria ya que permite convertir un producto líquido en polvo seco en una sola etapa controlando temperatura y tamaño de partícula. Nuestra Universidad tiene la suerte de tener plantas piloto que permiten formar a alumnos en esta importante técnica industrial a la que los hermanos Guadix, entre otros, han dedicado un notable esfuerzo.

Quisiera ahora extender en estos momentos mis comentarios más allá del carácter puramente académico y científico propios de este acto, para hacer referencia al perfil humano que hay detrás de la ingeniera química, la científica y hoy Académica. Emilia Guadix es una lojeña, la segunda de tres hermanos, nacida y criada en una familia en la que se enarbolan como valores fundamentales el esfuerzo y la capacidad de superación, principios que ella ha interiorizado y hecho suyos para conjugarlos con el rigor científico y el saber hacer Ciencia que aprendió de sus maestros. Emilia tiene una gran vocación científica, pasión a la que ha dedicado gran parte de su vida, pero también es una persona de una gran sensibilidad, que han



hecho de ella una amante de las artes, la música y el teatro en particular, y de una gran curiosidad por nuestro mundo, ella es una viajera incansable en busca del conocimiento de otros países, sus ciudades, sus costumbres y de la forma de ser de las personas que las habitan. He de confesar que a diferencia de lo que suele suceder en la mayoría de actos como el que hoy nos convoca aquí, Emilia y yo nos conocíamos solo a través de las reuniones conjuntas del Instituto de Biotecnología de esta Universidad, reuniones en las que ella siempre resalta por el gran rigor en sus análisis y comentarios. El encargo que en su día me encomendó esta Academia me ha posibilitado para tener un conocimiento en profundidad no solo sus importantes aportaciones científicas sino también de su interés transversal por el avance y buen funcionamiento de la Universidad Española y de una forma particular del fortalecimiento de las relaciones Universidad - Empresa, a las que tanto esfuerzo y tiempo ha dedicado.

En concordancia con el perfil científico y humano de la Académica, la reflexión conclusiva de su discurso nos asevera que los humanos hemos hecho con nuestro alimento no solo ciencia, tecnología, diseño, sino también arte. Tal reflexión de esta lojeña está en concordancia con el pensamiento de ilustres pensadores como el filósofo, poeta, físico, profesor y crítico literario francés Gaston Bachelard quien magníficamente enunció “La ciencia es la estética de la inteligencia”.

Al igual que ha hecho Emilia en su discurso, mi última frase la quiero dedicar a Vika solamente para decirle que tiene una madre que

cuando habla de ella se siente muy feliz y orgullosa superando infinitamente, como debe ser, la pasión que Emi siente por la Ciencia.

Muchas gracias