



Búsqueda de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en las proteínas presentes en la cerveza.

Eva Ramos Bécares

Máster universitario en Bioinformàtica y Bioestadística UOC-UB

Nombre Consultor: Melchor Sánchez Martínez

06/2016



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-
NoComercial-CompartirIgual [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	Búsqueda de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en las proteínas presentes en la cerveza.
Nombre del autor:	Eva Ramos Bécares
Nombre del consultor:	Melchor Sánchez Martínez
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2016
Área del Trabajo Final:	Bioinformática
Titulación:	<i>Máster universitario en Bioinformática y Bioestadística UOC-UB</i>
Resumen del Trabajo:	
<p>El objetivo de este trabajo es el estudio <i>in silico</i> de la posibilidad de obtener cerveza que contenga péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Debido a que esta enzima está involucrada en el aumento de la presión sanguínea, por lo tanto, el objetivo final es la producción de un producto funcional que ayude a regular la presión sanguínea de personas que sufran hipertensión.</p> <p>Una gran variedad de pequeños péptidos han sido previamente descritos en literatura como inhibidores de la ACE Durante este proyecto se realizó una selección de aquellos péptidos con IC₅₀ inferior a 20 20 μM y búsqueda de su presencia dentro de la estructura primaria de las proteínas más abundantes en la cerveza. Además, se comprobó que estos pequeños péptidos no pueden ser cortados por las enzimas presentes en el tracto digestivo.</p> <p>Tras la digestión <i>in silico</i>, se concluyó que mediante el uso de la enzima comercial proteinasa K se puede obtener una cerveza que contenga el péptido inhibidor de la ACE Ser-Tre. La interacción entre este péptido y la proteína fue comprobado mediante un ensayo de unión.</p> <p>Por lo tanto, se confirmó la posibilidad de crear una cerveza que contenga inhibidores de la ACE. Sin embargo, la formación de espuma puede verse comprometida y posiblemente la adición de estabilizadores será necesaria.</p>	

Abstract :

In this thesis an *in silico* feasibility study of the production of beer containing natural angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor peptides. As this enzyme is involved in blood pressure incensement, the final objective of this project is the production of a bioactive product that regulates blood pressure in patients suffering hypertension.

A great amount of small peptides that inhibit ACE have already been described. A selection of the most convenient ones was performed and their presence in the sequence of the most abundant proteins in beer was searched. After that, which peptides cannot be cleaved by the digestive enzymes was studied.

In silico enzymatic protein digestion resulted in the achievement of the ACE inhibiting peptide Ser-Tre after the cleavage with proteinase K. A protein-peptide docking approach was performed in order to confirm the interaction between both protein and peptide.

Therefore, the possibility of brewing a bioactive beer was confirmed. Nevertheless, it is important to mention that foam stability may be compromised and stabilisers may be needed.

Palabras clave

Cerveza, péptido inhibidor, , enzima convertidora de angiotensina, alimento funcional, presión sanguínea.

Índice

1. Introducción.....	4
1.1 Contexto y justificación del Trabajo	4
1.2. Teoría detrás del proyecto y estado del arte.	4
Hipertensión.....	4
Obtención de cerveza funcional	7
1.3 Objetivos del Trabajo.....	8
1.4 Enfoque y método seguido.....	9
1.5 Planificación del Trabajo.....	9
1.6 Breve resumen de productos obtenidos.....	10
2. Métodos y resultados	11
2.1 Fase 1: recolección de péptidos descritos en la literatura.	11
2.2 Fase 2: Búsqueda péptidos inhibidores de la ACE en la cerveza.	11
Estrategias fallidas.....	11
Alineamiento final:	13
Digestión con endoproteasas presentes en el tracto digestivo.....	14
Obtención de los péptidos.....	15
2.3 Ensayo de afinidad	16
2.4 Efectos en el producto final.....	17
2.5 Búsqueda de péptidos inhibidores de la ACE en LTPs	18
3. Conclusiones	14
4. Glosario	15
5. Bibliografía	16
6. Anexos.....	20
Anexo 1. Planificación	20
Anexo 2. Péptidos inhibidores de la ACE.....	21

Lista de figuras

Imagen 1. Prevalencia de la hipertensión normalizada por edades, en adultos de 25 años o más.	5
Imagen 2 <i>Relación entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el incremento de la tensión arterial</i>	5
Imagen 3. Costo total estimado de la ampliación de la intervención basada en el individuo con mejor relación calidad-precio en materia de enfermedades no transmisibles en todos los países de ingresos bajos y medianos.	6
Imagen 4. Consumo de cerveza en los distintos países del mundo	7
Imagen 5. Dipéptidos presentes en la estructura primaria de la proteína z de la cebada.	14
Imagen 6. Tripéptidos presentes en la estructura primaria de la proteína z de la cebada.	14
Imagen 7. Resultados obtenidos en el docking assay de la ACE con el dipeptido ST.	16
Imagen 8. Lugares de corte de la LTP1 por la proteinasa K.....	17
Imagen 9. Lugares de corte de la LTP2 por la proteinasa K.....	17
Imagen 10. Péptidos inhibidores de la ACE presentes en la estructura secundaria de la LTP1 ...	18
Imagen 11. Péptidos inhibidores de la ACE presentes en la estructura secundaria de la LTP2 ...	19

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En esta última década, la industria alimentaria se está centrando en la búsqueda de alimentos funcionales que no solo alimenten sino que ayuden a mejorar la salud de los consumidores. Son de particular interés aquellos alimentos que puedan ayudar en el tratamiento de enfermedades con gran prevalencia. Un ejemplo de enfermedades que se quiere tratar con alimentos bioactivos es la hipertensión.

La hipertensión afecta ya a mil millones de personas en el mundo, y puede provocar infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares, siendo la causa de la muerte de millones de personas cada año [1].

Hoy en día, la presión sanguínea se intenta controlar mediante un control de la dieta, cambios en el modo de vida y la ingesta diaria de medicamentos. Además, se conoce que el alcohol es en parte responsable del incremento de la presión sanguínea, por lo que su consumo está especialmente contraindicado dentro de la población hipertensa.

El objetivo de este proyecto es estudiar la posibilidad de crear una cerveza funcional que de forma natural ayude a la reducción de la presión sanguínea y, por lo tanto, ayude a la reducción de la toma de medicamentos y mejore la calidad de vida de la población hipertensa. Esto se realizará mediante la búsqueda de péptidos con potencial para inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ACE) dentro de las proteínas presentes en la cerveza.

1.2. TEORÍA DETRÁS DEL PROYECTO Y ESTADO DEL ARTE.

HIPERTENSIÓN.

El fallo cardiovascular es la principal causa mundial de muerte, siendo responsable del 30% de las mismas[2]. Según la Organización Mundial de la Salud, 17,5 millones de personas murieron en 2012 debido a este tipo de enfermedades y este número crecerá hasta los 23,3 millones en 2030 [3].

Dentro de las enfermedades cardiovasculares cabe destacar a la hipertensión por su frecuencia, consecuencias y complejidad. La hipertensión arterial es en la actualidad una de las frecuentes en los países desarrollados [4]. El riesgo de esta enfermedad no se encuentra en la enfermedad en sí, ya que es asintomática, sino en los riesgos que lleva asociados. La hipertensión es un indicador de futuro riesgo cardiovascular y la cronicidad de la enfermedad reduce la esperanza de vida, incrementando la mortalidad de forma lineal según los valores de la presión [5]. La tensión arterial es una variable de distribución continua y, por tanto, el límite a partir del cual se considera a una persona como hipertensa se establece de una forma puramente arbitraria por convenio, basado en los niveles de riesgo cardiovascular [6]. Además, se trata de una enfermedad compleja ya que se han descrito numerosos factores ambientales que afectan al desarrollo de la hipertensión, como son: la obesidad, circunstancias de nacimiento, las profesiones estresantes y el consumo de alcohol.

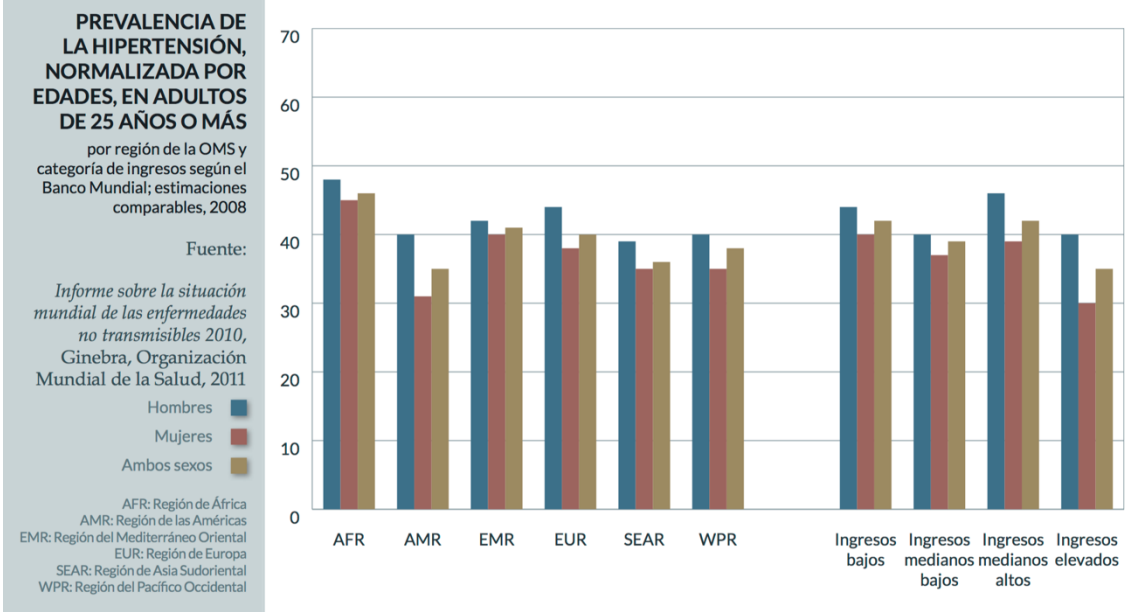


Imagen 1. Prevalencia de la hipertensión normalizada por edades, en adultos de 25 años o más.

Existen numerosos estudios que establecen firmemente la relación entre el consumo moderado y alto de alcohol y la presencia de hipertensión [7-9]. Esta relación se ha demostrado en ambos sexos, diferentes razas y es independiente del tipo de bebida alcohólica, adiposidad, educación, hábito tabáquico, consumo de sal y de otras varias características. Sin embargo, el mecanismo por el cual el alcohol eleva la presión aún no está claro.

Una de las rutas involucradas en el incremento de la presión sanguínea es el sistema renina-angiotensina-aldosterona [10]. Por lo tanto se ha visto que su inhibición es un tratamiento efectivo para el tratamiento de la hipertensión [11]. Dentro de los fármacos involucrados en la regulación de esta ruta, los inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE) son uno de los más recetados.

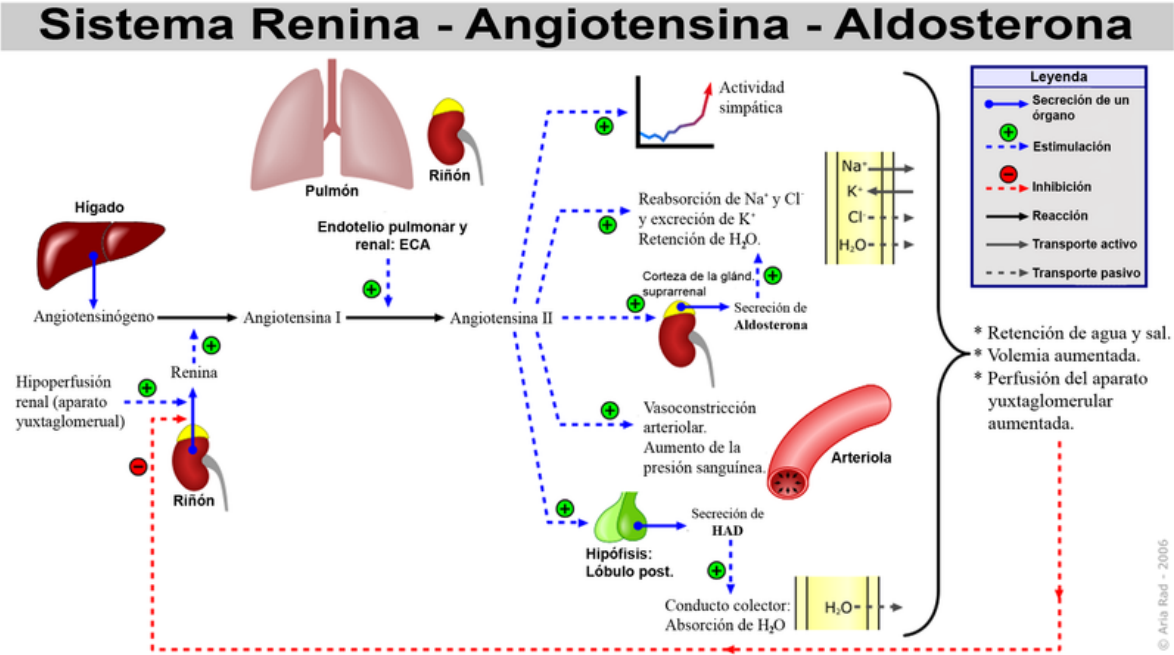


Imagen 2 Relación entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el incremento de la tensión arterial

La ACE (EC 3.4.15.1) actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, un decapeptido inactivo producido por la acción de la renina, liberando la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu. La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora cuya acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto, el incremento de la presión sanguínea. Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, lo cual induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. Esto provoca una acumulación de agua que incrementa el volumen extracelular, que consecuentemente aumenta de la tensión arterial. La ACE actúa simultáneamente en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, que también favorece el incremento de la tensión arterial [11, 12].

Debido a la prevalencia de la hipertensión y los buenos resultados obtenidos al usar inhibidores de la ACE, estos se han convertido en uno de los fármacos más consumidos en los países desarrollados [13]. Además también suponen uno de los mayores gastos en sanidad en países con ingresos bajos o medios [4]. El primer inhibidor fue encontrado en el veneno de una víbora y posteriormente análogos sintéticos fueron desarrollados y comercializados[14]. Sin embargo, el veneno de víbora no es la única fuente natural de péptidos inhibidores de la ACE, otros péptidos con actividades similares han sido encontrados en ciertos alimentos y potenciales inhibidores han sido descrito dentro de la estructura primaria de proteínas tanto de origen animal como vegetal [15-18].

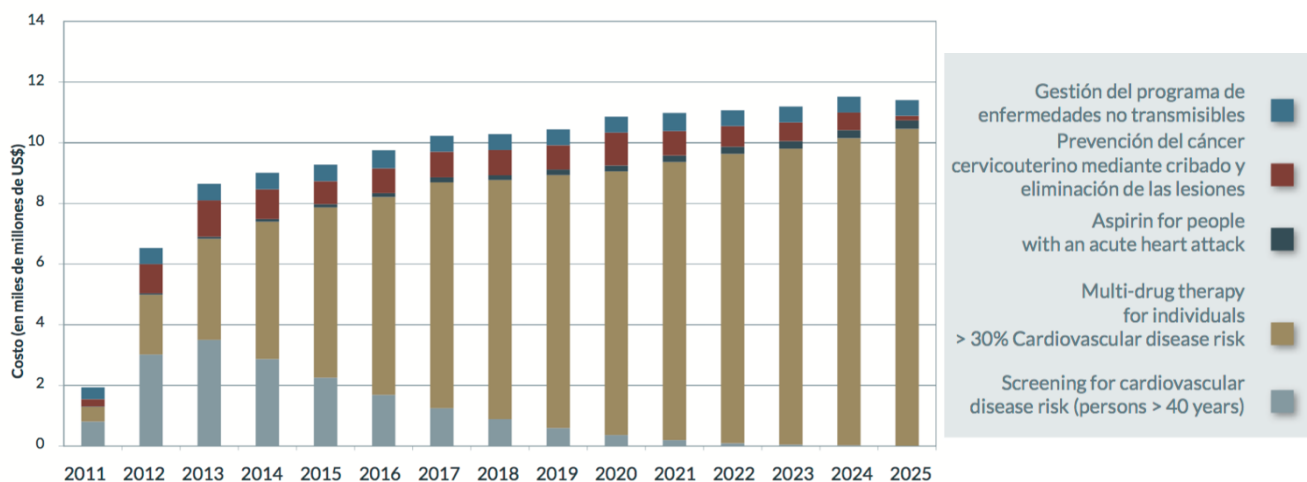


Imagen 3. Costo total estimado de la ampliación de la intervención basada en el individuo con mejor relación calidad-precio en materia de enfermedades no transmisibles en todos los países de ingresos bajos y medianos.

La secuencia tripeptídica C-terminal de los péptidos influye a la unión con la ACE, ya que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la ACE [19]. Así, aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro, favorecen la unión a estas zonas. Siendo el péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor de veneno de víbora, uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva de la Arg o Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria [20]. Por otro lado, la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE [21, 22]. El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido. La longitud también es un factor clave, cuanto más pequeños son, mayor es su función inhibitoria.

OBTENCIÓN DE CERVEZA FUNCIONAL

Hoy en día, la industria alimentaria se está centrando en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades y reducir el consumo de medicamentos. A los alimentos con estas características se les conoce como alimentos funcionales y deben cumplir ciertos requisitos. En primer lugar, debe ser consumido habitualmente como parte de la dieta normal. Debe estar constituido por ingredientes naturales no presentes en el alimento original o en mayor concentración a la existente en dicho alimento. Sus efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente y deben mejorar el estado de salud del individuo, su calidad de vida y/o disminuir el riesgo de ciertas patologías. Finalmente, sus efectos deben estar autorizados [23].

Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. La liberación de los péptidos bioactivos a partir de una secuencia proteica puede producirse bien por hidrólisis enzimática, por procesos fermentativos o bien por la combinación de ambos procesos, que tiene lugar bien durante el procesado de alimentos o bien durante la digestión gastrointestinal [24].

Dentro del grupo de los péptidos bioactivos, aquellos con actividad antihipertensiva han centrado el interés de los científicos y las industrias, debido al incremento de la mortalidad en los países industrializados por la hipertensión y/o por sus complicaciones.

En la mayoría de los países, las bebidas alcohólicas como cerveza o vino son una parte integral de la dieta y consisten de aproximadamente de un 4 a un 65% de la ingesta energética media. La cerveza es una bebida muy popular en España. En 2003, había una ingesta de aproximadamente 150,4 ml de cerveza por día/por persona [25]. Sin embargo, ha sido relacionada como una de las bebidas alcohólicas relacionadas con la hipertensión en esta población [25]. Por lo tanto, la obtención de una cerveza funcional con péptidos inhibidores de la ACE, que no solo contrarrestara el efecto negativo del alcohol sino que ayudara a mejorar la presión sanguínea, sería de gran interés para la industria cervecera.

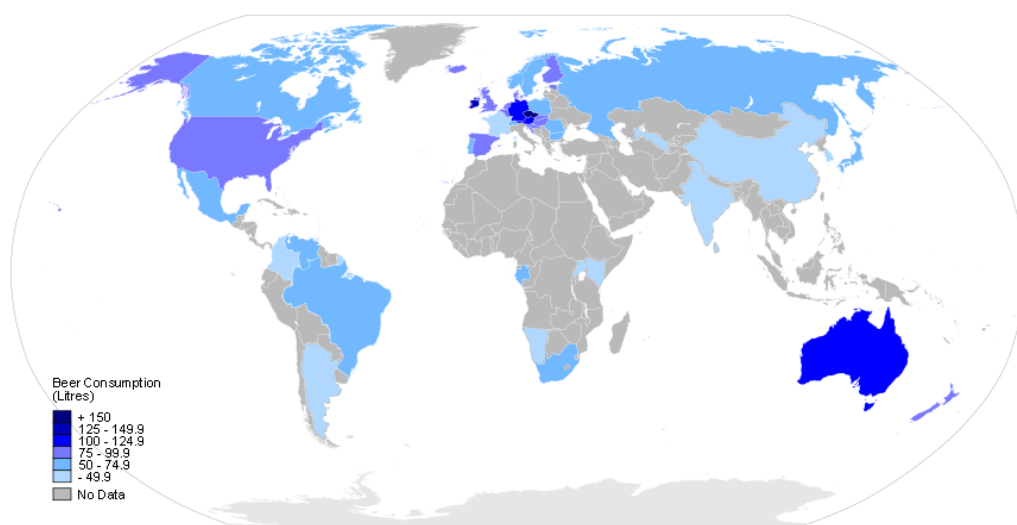


Imagen 4. Consumo de cerveza en los distintos países del mundo

La cerveza es una bebida de baja graduación alcohólica elaborada mediante la fermentación del mosto procedente de cereales que contienen almidón. Los cereales son transformables en azúcares por digestión enzimática, y cocción, y aromatizado con flores de lúpulo. La mayor parte de las cervezas se elaboran con cebada malteada que se da sabor con lúpulo, siendo los constituyentes de estas cerveza provienen de sus cuatro principales materias primas malta, lúpulo, agua, levadura.

A pesar de que el componente principal de los cereales son los azúcares, también contienen proteínas que pueden ser degradados y resultar en la obtención de los péptidos deseados (siempre en cuanto estos estén dentro de su secuencia aminoacídica). La degradación de las proteínas presentes en los ingredientes hasta péptidos puede ser el resultado de la propia fermentación llevada a cabo por la levadura, de las enzimas presentes en el trasto digestivo o de enzimas externas que se añadan durante su fabricación [26].

La capacidad de un péptido para desarrollar la actividad antihipertensiva *in vivo* depende de distintos factores, como el procesado al que ha sido sometido el alimento, la estabilidad del péptido, la capacidad de absorción y el mecanismo de inhibición de la ACE. Los péptidos deben permanecer activos tras la digestión por las enzimas digestivas y las proteasas presentes en el intestino y en el plasma sanguíneo [27]. Además, hay que tener en cuenta que la digestibilidad está influida por las condiciones del procesado y por las interacciones antagónicas y sinérgicas con otros componentes de la dieta. Asimismo, los péptidos de bajo peso molecular son muy reactivos, pudiendo interaccionar con carbohidratos y lípidos y no ser absorbidos. Una vez llegan a la microvellosidades intestinales, los péptidos pueden ser absorbidos y transportados al sistema sanguíneo, pero su actividad dependerá de la longitud del mismo. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en este estudio *in silico* deben ser probados en el laboratorio ya que en muchos casos se ha visto que los resultados *in vitro* e *in vivo* difieren. Esto es debido a que los péptidos deben llegar de forma activa a la enzima diana para ser efectivos.

También hay que tener en cuenta que la presencia de péptidos pequeños puede incrementar la amargura del producto final [28]. El característico sabor amargo de la cerveza suele deberse a la adición del lúpulo. Por lo tanto, es posible que para que no resulte demasiado amarga, haya que añadir menos lúpulo en la formulación final.

1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. Recolectar los péptidos inhibidores de la ACE que tengan una concentración IC50 (a la cual el 50% de la actividad de la enzima se encuentra inhibida) igual o menores a 20 μ M.
2. Buscar péptidos inhibidores de la ACE dentro de las proteínas de la cerveza.
3. En caso de haber péptidos inhibidores de la ACE en la estructura primaria de alguna de las proteínas, estudiar si resistirían el paso por el sistema digestivo.
4. En caso de haber péptidos inhibidores de la ACE en la secuencia de alguna de las proteínas que resistan el paso por el sistema digestivo, encontrar una forma sencilla de conseguirlos en el producto final.

1.4 ENFOQUE Y MÉTODO SEGUIDO

En el trabajo solo se recolectaran y tendrán en cuenta los péptidos descritos en la bibliografía con una concentración IC50 (a la cual el 50% de la actividad de la enzima se encuentra inhibida) igual o menores a 20 μ M. Se ha decidido poner este límite a pesar de que poner esta restricción dentro de la búsqueda reduce la probabilidad de encontrar posibles inhibidores dentro del producto, ya que péptidos cuya IC50 sea muy elevada implica que deben encontrarse en grandes cantidades en el producto para que tengan efecto. La concentración de proteínas en el producto final es bastante reducida, debido a la degradación de parte de ellas durante el malteado y por la levadura y a su precipitación en ciertas partes del proceso de fabricación. Por lo tanto, la concentración final de péptido inhibidor que se puede conseguir no es demasiado elevada y, por tanto, debe ser lo suficientemente activo como para cumplir su función a bajos niveles.

En primer lugar, se realizó una búsqueda de los péptidos con las características deseadas dentro de las proteínas más abundantes descritas en el proteoma de la cebada, trigo y la malta. Solo se tuvieron en cuenta estas proteínas ya que son la única fuente que puede proporcionar concentraciones efectivas en el producto final. Un péptido que se encuentre en una proteína que es expresada a bajos niveles nunca podrá ser obtenido, en el producto final, a una concentración mayor o igual a su IC50. Por lo tanto, para alcanzar concentraciones efectivas se necesitaría o bien una extensa degradación de las proteínas o bien su posterior adición al producto. Ya que los péptidos son en gran parte responsables de las propiedades organolépticas, estos procesos podrían llevar a cambios indeseados. En este caso solo se tuvo en cuenta los ingredientes vegetales y no la propia levadura, debido a que en la fabricación de la cerveza a escala industrial, en muchos casos la levadura es retirada del producto final. Por lo tanto, sus proteínas no se encuentran presentes en el producto que llega al consumidor. Sin embargo, esta estrategia resulto poco productiva, como se explica posteriormente, además de que posteriormente se vio que esta estrategia no tendría sentido ya que la mayoría de las proteínas analizadas no se encuentran en el producto final. Por lo tanto, un nuevo enfoque fue necesario.

Para continuar con el proyecto, se realizó una búsqueda de las proteínas que se encuentran en mayor concentración en la cerveza. Por lo tanto, a la hora de realizar el estudio final, solo se ha tenido en cuenta la proteína más abundante y cuya degradación afecte lo mínimo posible el producto final.

1.5 PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO

Este se trata de un estudio *in silico*, por lo que no se llevaran a cabo comprobaciones en el laboratorio de ningún tipo. Por lo tanto, para llevar a cabo este proyecto solamente serán necesarios: una gran biblioteca de artículos referentes a péptidos inhibidores de la ACE, los proteomas de la cebada, el trigo y la malta, información sobre las proteínas presentes en la cerveza como producto final y el archivo PDB de la ACE.

En la planificación inicial, el proyecto fue dividido en tres fases:

Fase 1. Búsqueda de las características comunes de los péptidos inhibidores de la ACEM ya descritos en la bibliografía.

1.1. Búsqueda bibliográfica enzima, tensión arterial y cerveza.

1.2. Búsqueda bibliográfica péptidos.

- 1.3. Recolección de péptidos y diseño de base de datos con los mismos.
 - 1.4. Búsqueda de características comunes de los péptidos.
- Fase 2. Búsqueda de péptidos inhibidores de la ACE dentro del proteoma de los principales ingredientes de la cerveza.
- 2.1. Búsqueda en el proteoma de cebada.
 - 2.2. Búsqueda en el proteoma de trigo.
 - 2.3. Búsqueda en las proteínas descritas y genoma de la malta.
 - 2.4. Búsqueda de otros genomas si algo sale mal/análisis de resultados.
- Fase 3. Últimos ajustes y escribir el trabajo.
- 3.1. Margen de error/nuevas ideas.
 - 3.2. Escribir la memoria final.
 - 3.3. Entrega memoria.
 - 3.4. Presentación.

El diagrama de la planificación puede verse en el anexo 1.

Como se ha comentado con anterioridad, un cambio en la estrategia general fue necesaria. Como se habían definido dos semanas de margen de error, una para búsqueda de otros genomas y otra de ideas nuevas, el proyecto pudo ser terminado dentro de las fechas establecidas. Para ello, se utilizó la semana de búsqueda de nuevos genomas para buscar las proteínas presentes en la cerveza y el estudio de la presencia de péptidos inhibidores de la ACE en las mismas, y la segunda semana para el estudio de si dichos péptidos resistirían el paso por el sistema digestivo, encontrar una forma sencilla de conseguirlos en el producto final y estudiar posibles efectos en el producto final.

1.6 BREVE SUMARIO DE PRODUCTOS OBTENIDOS

Tras este estudio *in silico*, la posibilidad de obtener una cerveza funcional que ayude a controlar la presión sanguínea parece posible.

Además, como se generarán una memoria, una presentación y una autoevaluación del trabajo como productos del trabajo.

2. MÉTODOS Y RESULTADOS

2.1 FASE 1: RECOLECCIÓN DE PÉPTIDOS DESCRITOS EN LA LITERATURA.

Mediante la búsqueda en literatura, se han recolectado una lista de péptidos inhibidores de la ACE que son activos a una concentración IC50 (a la cual el 50% de la actividad de la enzima se encuentra inhibida) igual o menores a 20 μ M. Dichos péptidos han sido recopilados en un archivo fasta que contiene una única vez todos aquellos péptidos. La base de datos generada consiste en los péptidos ordenados por longitud y de manera alfabética, nombrados según la secuencia y el artículo donde fueron encontrados. Un total del 174 péptidos fueron documentados [15, 16, 18, 20, 24, 29-66].

La anotación se ha realizado de manera manual ya que en cada caso se debía comprobar la actividad descrita y no existe ninguna base de datos en la actualidad que ofrezca dicha información.

En el anexo 2 se encuentra una lista completa de los péptidos seleccionados y una fuente bibliográfica donde puede ser encontrado.

2.2 FASE 2: BÚSQUEDA PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE EN LA CERVEZA.

Esta segunda etapa del proyecto se basaba en la búsqueda de los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) dentro de las proteínas de la cebada, el trigo y el lúpulo. Debido a problemas a la hora de obtener resultados con la estrategia planteada en un primer momento, no se ha seguido el plan inicial, sino que se han ido probando otras aproximaciones que se detallan a continuación.

ESTRATEGIAS FALLIDAS.

El primer método propuesto y probado fue realizar un BLAST entre el fichero fasta creado con los péptidos inhibidores de la ACE y los distintos proteomas usando la herramienta de BLAST del NCBI [67, 68]. No se obtuvo ninguna correlación como respuesta. La falta de resultados no se debe a que estos péptidos no se encuentren en ninguna de las estructuras primarias de las proteínas de los proteomas de estos organismos sino a que debido a que la mayoría de estos péptidos son di- y tripéptidos, la puntuación obtenida en el alineamiento no es lo suficientemente alta como para que se muestren como resultado. Viendo que esta herramienta no iba a tener utilidad, se procedió a realizar el alineamiento mediante el uso de otros softwares.

Hoy en día, existen multitud de herramientas online que nos permiten realizar alineamiento de secuencia. En este trabajo sólo se utilizan una pequeña parte de todas las posibles como son la herramienta BLAT del UCSC [69, 70], SequenceServer 1.0.8 [71], la herramienta BLAST de ExPASy [72], la herramienta FASTM de EMBL-EBI [73]. Ninguna de estas herramientas reportó ninguna conexión entre los péptidos inhibidores de la ACE y los distintos proteomas. Esto se debe al mismo problema que al realizar la alineación con BLAST, no a la falta de resultados compatibles.

A continuación, se explicará brevemente algunas de las diferencias entre las diferentes herramientas utilizadas.

La herramienta BLAST del NCBI te permite realizar gran cantidad de alineamientos de secuencias tanto aminoacídicas como nucleotídicas. El alineamiento se hace comparando la secuencia problema frente a la base de datos y calculando la significatividad de los matches. Esta herramienta te permite personalizar tu búsqueda, pudiendo ajustar múltiples variables (como la database de dónde quieres que se extraigan las coincidencias, el organismo en el que te interesa buscar y parámetros dentro del algoritmo de búsqueda) para que tu búsqueda sea lo más óptima posible. Sin embargo, no es capaz a reconocer péptidos demasiado pequeños, ya que el score que consiguen no es lo suficientemente alto como para que se muestre en resultados.

Por otra parte, la herramienta BLAT del UCSC necesita una alineación perfecta o muy parecida para mostrar el alineamiento como resultado, por lo que no es tan flexible como blast. En este caso, BLAT contiene un índice del genoma y del proteoma completo, por lo que la búsqueda es más rápida. En este caso, la búsqueda no es tan personalizable, ya que la mayoría de los parámetros de búsqueda vienen preestablecidos. Pero como en el caso anterior, no da resultados para secuencias demasiado cortas.

La herramienta BLAST de Sequence Server no se encuentra de manera on-line. Por lo que, aunque es muy parecida a la alineación BLAST del NCBI, el paquete debe ser descargado e instalado. Esta herramienta está diseñada para mostrar de una forma fácil y sencilla, haciendo que el usuario tenga que tomar la menor cantidad de decisiones posible. Por lo tanto, es muy útil para gente que este empezando con alineamientos y no tenga gran conocimiento de los parámetros de búsqueda y como ajustarlos. Esta base de datos tampoco da matches con di y tripéptidos.

Por otro lado, la herramienta de BLAST de ExpASy se base en los mismos principios que la del NCBI, pudiendo también escoger entre diferentes variables como el tipo de matriz. En este caso, se usa como base de datos de proteínas UniProt y la base de datos European Nucleotid Archive (ANE) para la búsqueda de secuencias genómicas. Por lo tanto, al usar bases de datos diferentes, los resultados pueden variar. Sin embargo, como usa un sistema similar al de BLAST del NCBI, tampoco resulta útil para secuencias cortas.

FASTM de EMBL-EBI es una herramienta especializada en el alineamiento de proteínas. Esta realiza alineamientos locales entre tu muestra y una colección de péptidos. En este caso puedes escoger entre diferentes bases de datos (incluyendo la de patentes) y multitud de parámetros para conseguir un alineamiento que se ajuste a tus necesidades. Sin embargo, como en los casos anteriores, no se consiguen buenos resultados con péptidos muy pequeños.

Por lo tanto, la herramienta a usar depende de lo que busques. No se puede decir que una sea más óptima que la otra, sino que la base que debes usar depende de lo que quieras obtener. Por ejemplo, si se buscan alineamientos con secuencias remotas es mejor usar BLAST y si se quiere una respuesta más rápida y una alineamiento más preciso es mejor usar BLAT.

A la vista de que un alineamiento general no iba a funcionar, se diseñó una nueva estrategia. El proteoma de los distintos organismos fue descargado y se hizo un alineamiento local de los proteomas y las secuencias fasta con los péptidos inhibidores gracias a la ayuda de Emboss [74].

Se hizo una búsqueda de secuencias idénticas con la herramienta Wordmatch. Esta herramienta, solo encuentra alineamientos exactos. Por lo tanto, una vez descrito la longitud mínima del alineamiento, solo encontraremos aquellos lugares donde ambas secuencias coinciden exactamente. En este caso debemos introducir tanto la muestra problema como la base de datos donde queramos buscar. En este caso, se pueden realizar alineamientos entre secuencias muy cortas. Sin embargo, esta forma de alineamiento solo es útil si nos interesa encontrar una secuencia dentro de proteínas de nuestro interés, como es nuestro caso, no para la búsqueda de secuencias cercanas a la problema.

Para poder definir la longitud de de palabra acorde a la longitud de del péptido, y así evitar alineamientos en los que solo se tuviera en cuenta una parte de los péptidos, el fichero fasta con los péptidos original fue dividido en distintos ficheros con solamente los péptidos de igual longitud de en cada uno de ellos.

Como base de datos se utilizó el proteoma descrito para la cebada.

En este caso, el problema fue el contrario. Debido a que se hace un alineamiento entre multitud de di- y tripéptidos y miles de proteínas, el número de resultados es demasiado alto, por lo que es difícil de resumir y el estudio pierde el sentido, ya que no podemos centrarnos en cómo conseguir el péptido que queremos en una proteína específica sino que tendríamos que estudiar demasiadas proteínas por separado. Además, muchos de los resultados propuestos involucran proteínas que solo se expresan en condiciones muy determinadas o en ciertos estadios del desarrollo de la planta, en zonas de la planta diferentes a la semilla o se expresan en tan baja cantidad que su concentración en el producto final es prácticamente nula. Por lo tanto, es necesario un nuevo cambio de estrategia.

ALINEAMIENTO FINAL:

Perrocheau et al. describieron las proteínas que se encuentran mayor concentración en la cerveza [26]. Como nos interesa que nuestro péptido inhibidor se encuentre en concentraciones en las cuales resulte activo, sólo tiene sentido tener en cuenta estas proteínas a la hora de hacer el estudio y, por lo tanto, en el alineamiento.

Las proteínas más abundantes dentro de la cerveza son la proteína Z (también conocida como serpin-like cysteine protease inhibitor) y las proteínas transferidoras de lípidos (LTPs) 1 y 2. Estas segundas proteínas son un poco menos abundantes y muy importantes para la formación de espuma, característica que la mayoría de los consumidores cree fundamental en una cerveza, nos centraremos en la búsqueda dentro de la proteína z.

Mediante el uso de la página del NCBI obtenemos la secuencia de la proteína en formato fasta [75]:

```
>gi|19068|emb|CAA36015.1| protein Z [Hordeum vulgare]
MATTLATDVRLSIAHQTRFALRLRSAISSNPERAAGNVAFSPSLHVALSLITAGAAATRDQLVAILGDG
GAGDAKELNALAEQVVQFVLANESSTGGPRIAFANGIFVDASLSLKPSFEELAVCQYKAKTQSVDFQHKT
LEAVGQVNSWVEQVTGLIKQILPPGSVDNNTKLILGNALYFKGAWDQKFDESNTKCDSFHLLDGSSIQT
QFMSSTKKQYISSSDNLKVLKLPYAKGHDKRQFSMYILLPGAQDGLWSLAKRLSTEPEFIENHHPKQTV
VGRFQLPKFKISYQFEASSLLRALGLQLPFSEEDLSEMVDSSQGLEISHVFKSFVEVNEEGTEAGAAT
VAMGVAMSMPLKVDLVDFVANHPFLFLIREDIAGVVVFVGHVTNPLISA
```


Se realizó un alineamiento entre la secuencia de la proteína y los distintos archivos .fasta que contienen los dipéptidos, tripéptidos, etc. con la ayuda de Wordmatch de Emboss [74], siguiendo la misma técnica usada en el último intento del apartado anterior pero en este caso con solo una proteína como fuente de alineamientos. En cada caso se ajusta la longitud de palabra a la longitud del péptido. Obtenemos que existen coincidencias con 16 secuencias, 12 dipéptidos y 4 tripéptidos.

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region proteinZ 1 399
#!Date 2016-05-18
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      39      40      1      .      .      ID=proteinZ.1;note=AF
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      102     103     1      .      .      ID=proteinZ.2;note=AF
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      185     186     1      .      .      ID=proteinZ.3;note=AW
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      69      70      1      .      .      ID=proteinZ.4;note=DG
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      204     205     1      .      .      ID=proteinZ.5;note=DG
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      254     255     1      .      .      ID=proteinZ.6;note=DG
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      135     136     1      .      .      ID=proteinZ.7;note=DF
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      367     368     1      .      .      ID=proteinZ.8;note=DF
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      119     120     1      .      .      ID=proteinZ.9;note=FE
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      295     296     1      .      .      ID=proteinZ.10;note=FE
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      374     375     1      .      .      ID=proteinZ.11;note=FL
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      376     377     1      .      .      ID=proteinZ.12;note=FL
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      116     117     1      .      .      ID=proteinZ.13;note=KP
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      256     257     1      .      .      ID=proteinZ.14;note=LW
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      180     181     1      .      .      ID=proteinZ.15;note=LY
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      99      100     1      .      .      ID=proteinZ.16;note=PR
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      95      96      1      .      .      ID=proteinZ.17;note=ST
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      215     216     1      .      .      ID=proteinZ.18;note=ST
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      264     265     1      .      .      ID=proteinZ.19;note=ST
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      331     332     1      .      .      ID=proteinZ.20;note=VF
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      387     388     1      .      .      ID=proteinZ.21;note=VF
```

Imagen 5. Dipéptidos presentes en la estructura primaria de la proteína z de la cebada.

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region proteinZ 1 399
#!Date 2016-05-18
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      254     256     1      .      .      ID=proteinZ.1;note=DGL
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      115     117     1      .      .      ID=proteinZ.2;note=LKP
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      248     250     1      .      .      ID=proteinZ.3;note=LLP
proteinZ      wordmatch      polypeptide_region      163     165     1      .      .      ID=proteinZ.4;note=LLP
```

Imagen 6. Tripéptidos presentes en la estructura primaria de la proteína z de la cebada.

DIGESTIÓN CON ENDOPROTEASAS PRESENTES EN EL TRACTO DIGESTIVO.

Debido a que los péptidos deben llegar intactos a la enzima, estos no pueden contener dianas de restricción para las endoproteasas presentes en el digestivo. Para realizar el estudio *in silico* en el que se compruebe la resistencia de los péptidos descritos anteriormente a atravesar el aparato digestivo sin ser degradados se utilizó la herramienta PeptideCutter de ExPASy [76]. Seleccionamos cortar con las endoproteasas más abundantes presentes en el tracto digestivo: tripsina, quimotripsina y la peptinas; y llevamos a cabo la digestión virtual de los péptidos. Obtenemos que la mayor parte de los péptidos son degradados por al menos una de las enzimas estudiadas (Tabla 1) y, por lo tanto, no serán capaces de llegar intactas a la ACE y tener actividad inhibidora.

Tabla 1. Corte de los péptidos inhibidores de la ACE presents en la estructura primaria de la proteína z por las enzimas digestivas

	AF	AW	DG	DF	FE	FL	KP	LW	LY	PR	ST	VF	DGL	LKP	LLP	LPP
Tripsina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Quimotripsina	x	x	x	x	✓	✓	x	✓	✓	x	x	x	x	✓	✓	x
Pepsina	✓	✓	x	✓	✓	✓	x	✓	✓	x	x	✓	✓	x	✓	x

Podemos ver que solamente los péptidos DG, KP, PR, ST y LPP son capaces de atravesar el sistema digestivo sin ser degradados, por lo tanto son los que son de interés en nuestro producto y nos interesa seguir estudiando.

OBTENCIÓN DE LOS PÉPTIDOS

Una vez hemos definido los péptidos de interés, tenemos que encontrar una forma de conseguirlos en nuestro producto final.

La forma más sencilla es el uso de una proteasa que corte la proteína Z y libere los péptidos deseados. Así pues, a la hora de fabricar la cerveza, se llevarían a cabo todos los pasos que se llevan a cabo normalmente en la fabricación de la cerveza y antes de esterilizar la cerveza mediante choque térmico, se añadiría una proteasa que cortara la proteína Z y liberara péptidos inhibidores de la ACE. Tras ello se llevaría a cabo el choque térmico que se suele llevar a cabo para poner fin a la fermentación y para asegurar que el producto es seguro para el consumo humano y que no presenta ningún patógeno. En este caso, con este choque térmico también conseguiríamos parar la digestión enzimática.

Para comprobar si esta estrategia sería posible, se realiza una simulación virtual del corte de la proteína con distintas proteasas comerciales. Para ellos se usó de la herramienta PeptideCutter de ExPASy [76]. Obtenemos que al añadir proteinasa K el péptido ST que se encuentra entre las posiciones 264 Y 265 de la proteína Z es liberado.

Así pues, se puede concluir que según los estudios *in silico* es posible la producción de una cerveza que contenga péptidos inhibidores de la ACE. Para su producción solo sería necesario añadir proteinasa K al último biorreactor o hacer pasar la cerveza por un biorreactor con la enzima movilizada. Seguramente esta última opción sea la más conveniente en este caso, ya que nos permite reutilizar la proteasa y además no queda en el producto final.

Cabe destacar que según Yu-Kai et al. , este péptido posee altas propiedades inhibitoras con un IC_{50} de tan solo $4.03 \pm 0.10 \mu M$ cuando es obtenido mediante fermentación de *Acetes chinensis* por *Lactobacillus fermentum* SM 605 [77]. Por lo tanto, se esperan valores similares al realizar el estudio *in vitro* con el mismo péptido obtenido desde la proteína z. Mas, no hay que pasar por alto que en este caso la IC_{50} ha sido medida con enzima en solución y los resultados pueden variar al llevar a cabo experimentos en humanos, debido a variables como la absorción del péptido en el intestino.

También hay que tener en cuenta que tras el uso de proteinasa K obtendremos péptidos que contienen los di- y tripéptidos inhibidores de la ACE en su estructura secundaria y que pueden ser degradados por las enzimas del tracto digestivo. Por lo tanto, es posible que alguno de los otros péptidos descritos sean liberados dentro del sistema digestivo y aumente las propiedades

hipotensoras del producto. Debido a que la cerveza es un producto complejo y su digestión y absorción por el cuerpo humano es un proceso aún más complejo, los resultados obtenidos *in silico*, aunque prometedores, tienen una fiabilidad limitada y deberían ser comprobada mediante estudios en el laboratorio.

2.3 ENSAYO DE AFINIDAD

La interacción entre el péptido ST y la proteína fue comprobado gracias al uso de la herramienta SwissDock del SIB [78]. Sólo se ha tenido cuenta este péptido, a pesar de que hay otros péptidos que se encuentran dentro de la estructura secundaria que también tienen propiedades inhibitoras de la ACE, debido a que es el único que sabemos que se encontrara segura dentro del producto final. Como hemos comentado anteriormente, el resto se encuentran dentro de péptidos más largos, los cuales no han sido definidos como inhibidores de la ACE.

En primer lugar se generó un archivo mol2 del péptido, mediante el uso de Peptide helix builder de Jmol [79, 80], y se modeló mediante el uso de Avogadro [80, 81], haciendo una minimización de energía.

Tras ello se realizó el docking utilizando como el target selection un archivo pdb de la ACE de las opciones dentro de la herramienta, concretamente la proteína con PDB ID 1O8A, y el archivo .mol2 del péptido como ligand selection. Viendo los resultados podemos concluir que el péptido es capaz de unirse a la proteína. Puede interactuar en diferentes cavidades, siendo la más probable la 11, que se puede ver en la imagen 7.

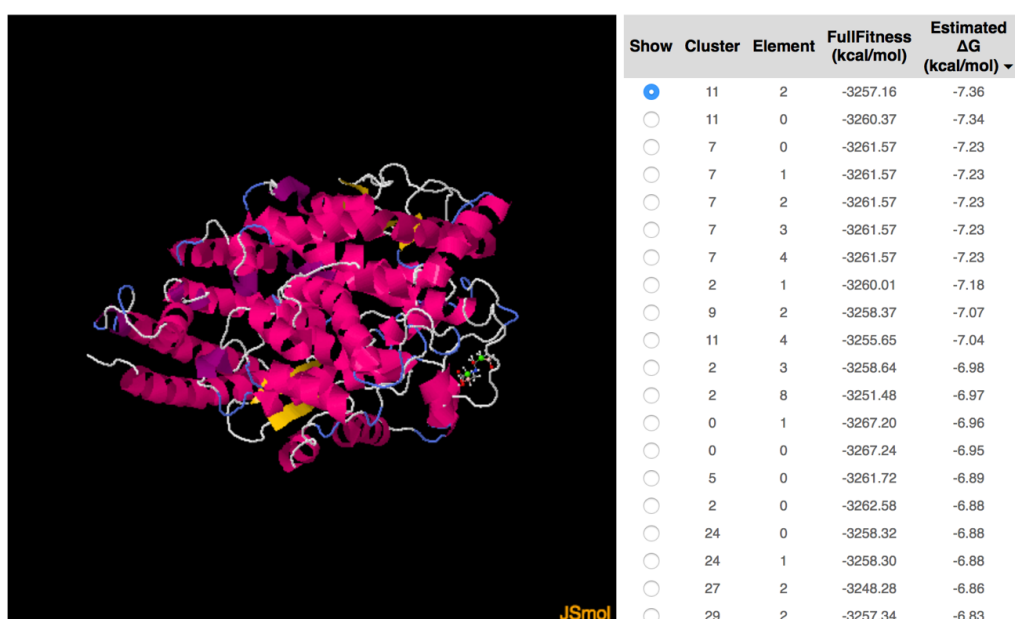


Imagen 7. Resultados obtenidos en el docking assay de la ACE con el dipéptido ST.

Podemos ver también que existen numerosas cavidades donde el péptido puede reaccionar adoptando varias conformaciones con una afinidad razonablemente alta. Esto se debe a que es difícil discernir cuando un péptido es pequeño, ya que tiende a tener mucha reactividad contra la proteína y los métodos de docking no suelen estar preparados para ser lo suficientemente selectivos con péptidos y moléculas pequeñas. Sin embargo, se puede concluir la interacción, aunque no se pueda saber con exactitud en qué lugar de la proteína.

2.4 EFECTOS EN EL PRODUCTO FINAL.

El hecho de añadir una proteasa al producto final puede llevar consigo cambios en el producto final. Sobretodo esperamos cambios en las propiedades organolépticas del producto y en la formación de espuma.

El uso de la proteinasa K resulta en la degradación de la proteína z en péptidos muy pequeños. Se sabe que la presencia de péptidos pequeños resulta en un sabor amargo en el producto final. En este caso, esto no tiene por qué resultar un problema ya que la cerveza se caracteriza por tener precisamente este sabor. Normalmente, el amargor se consigue gracias a la adición de lúpulo, por lo que a la hora de fabricar esta cerveza es posible que no sea necesario añadir lúpulo o que se necesiten menores cantidades.

Un problema mayor resulta la formación de espuma, la cual está relacionada con la presencia de las proteínas LTP1 y 2 [75].

```
>LTP1 Non-specific lipid-transfer protein 1 OS=Hordeum vulgare GN=LTP1
PE=1 SV=1
MARAQVLLMAAALVLMMLTAAPRAAVALNCGQVDSKMKPCLTYVQGGPGPSGECCNGVRDL
HNQAQSSGDRQTVCNCLKGIARGIHNLNLNNAASIPSKCNVNPYITISPDIDCSRIY
```

```
>LPT2 Non-specific lipid-transfer protein Cw18 OS=Hordeum vulgare
GN=CW18 PE=1 SV=1
MARTAATKLALVALVAAMLLVAADAAITCGQVSSALGPCAAYAKGSGTSPSAGCCSGVKR
LAGLARSTADKQATCRCLKSVAGAYNAGRAAGIPSRGVSVPYITISASVDCSKIH
```

En primer lugar buscamos las secuencias de estas dos proteínas, mediante el uso de la página del NCBI .

Si llevamos a cabo un estudio de proteólisis de las LTPs 1 y 2 con un tratamiento con proteinasa K (mediante el uso la herramienta PeptideCutter de Expasy, como en casos anteriores), vemos que la proteínas resultan gravemente degradadas [76].

These enzymes cleave the sequence:

Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Proteinase K	48	2 4 6 7 8 10 11 12 13 14 15 17 18 19 20 23 24 25 26 27 32 40 41 42 43 52 57 60 64 72 73 77 80 81 84 87 89 92 93 95 101 103 105 106 107 111 116 117

Imagen 8. Lugares de corte te la LTP1 por la proteinasa K

These enzymes cleave the sequence:

Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Proteinase K	58	2 4 5 6 7 9 10 11 12 13 14 15 16 17 19 20 21 22 23 25 26 27 28 32 35 36 40 41 42 43 48 52 58 61 62 64 65 68 69 73 74 78 81 82 84 85 87 90 91 93 99 101 103 104 105 107 109 114

Imagen 9. Lugares de corte te la LTP2 por la proteinasa K

Como se ha mencionado, esto seguramente tenga graves consecuencias en la formación de espuma en el producto final, ya que son estas proteínas las encargadas de estabilizarla.

Ya que la espuma es uno de los factores claves a la hora de producir una buena cerveza, será necesario desarrollar una solución a este problema.

No se puede hacer que la proteasa solo degrade nuestra proteína de interés. La única forma en la que eso sería posible consistiría en separar los dos tipos de proteínas (mediante alguna técnica de separación de moléculas, como una cromatografía), degradar la proteína de interés y luego

añadir las diferentes fases obtenidas en la separación y la proteína degradada al producto final. Pero esta opción no es viable a la hora de realizar el proceso a escala industrial.

Otra forma con la que no veríamos comprometida la formación de espuma sería mediante la realización de dos batches de cerveza: uno que será degradado y uno en el que se mantendrán las LTPs intactas. Tras ello, los péptidos obtenidos en el primer batch pueden ser añadidos al segundo batch, obteniendo una cerveza con las dos cosas, las proteínas enteras y los péptidos. Pero en este caso, además de incrementar el precio del producto final, se está diluyendo la cantidad de péptido en el producto final, por lo que es posible que la concentración no sea lo suficientemente alta como para resultar activas.

Otra manera sería mutar todos los sitios de corte presentes en las LTPs y cambiarlos por secuencias aminoacídicas que no sean reconocidas por la proteasa. Así pues, podemos ver los sitios de corte gracias a la herramienta de PeptideCutter de ExPASy y modificar esos sitios de corte. A la hora de hacer esas modificaciones deberemos tener en cuenta las propiedades físico químicas de los aminoácidos que cambiemos, para que la estructura y las propiedades de la proteína resultante sea lo más parecido posible a la wild type. Sin embargo, esta opción tiene grandes desventajas. Aparte de que modificar la proteína en tantos puntos es bastante laborioso y es muy difícil no modificar las propiedades de las proteínas, estaríamos hablando de una proteína genéticamente modificada en un alimento. Hoy en día, la política anti-organismos genéticamente modificados es bastante estricta en casi todo el mundo y los productos que los contienen generalmente no son aceptados por la mayoría de los consumidores, por lo que nuestra cerveza no estaría permitida en la mayoría del mundo y no tendría mucho éxito en el mercado.

Para conseguir una cerveza con espumase pueden añadir estabilizadores de espuma comerciales. Se trata de un producto que ya se ampliamente usado en la industria cervecera. Simplemente con añadirlo antes del embotellado, conseguiremos un producto con los péptidos inhibidores de la ACE que deseamos y con una formación de espuma óptima.

2.5 BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE EN LTPS

Como las LTPs 1 y 2 van a ser degradadas de todas formas, es interesante estudiar la presencia de péptidos inhibidores dentro de las estructura primaria de estas proteínas.

Llevamos a cabo la misma estrategia usada con proteína z [74].

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region 1 117
#!Date 2016-05-26
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
wordmatch polypeptide_region 116 117 1 . . ID=.1;note=IY
wordmatch polypeptide_region 37 38 1 . . ID=.2;note=KP
wordmatch polypeptide_region 21 22 1 . . ID=.3;note=PR
```

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region 1 117
#!Date 2016-05-26
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
wordmatch polypeptide_region 13 15 1 . . ID=.1;note=LVL
```

Imagen 10. Péptidos inhibidores de la ACE presentes en la estructura secundaria de la LTP1

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region 1 115
#!Date 2016-05-26
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
wordmatch polypeptide_region 41 42 1 . . ID=.1;note=AY
wordmatch polypeptide_region 84 85 1 . . ID=.2;note=AY
wordmatch polypeptide_region 67 68 1 . . ID=.3;note=ST
wordmatch polypeptide_region 58 59 1 . . ID=.4;note=VK
```

OUTPUT FILE [aoutfeat](#)

```
##gff-version 3
##sequence-region 1 115
#!Date 2016-05-26
#!Type Protein
#!Source-version EMBOSS 6.6.0.0
wordmatch polypeptide_region 36 38 1 . . ID=.1;note=LGP
```

Imagen 11. Péptidos inhibidores de la ACE presentes en la estructura secundaria de la LTP2

Vemos que en ambos casos existen posibles péptidos inhibidores de la ACE. Por lo que vamos a estudiar cuáles de ellos resistirían el paso por el tracto digestivo [76].

Tabla 2. Corte de los péptidos inhibidores de la ACE presentes en la estructura primaria de las LTPs por las enzimas digestivas

	IY	KP	PR	LVL	AY	ST	VK	LGP
Tripsina	x	x	✓	x	x	x	✓	x
Quimotripsina	✓	x	x	x	✓	x	x	✓
Pepsina	✓	x	x	✓	✓	x	x	x

Vemos que en este caso solo el dipéptido KP de la LPT1 y el dipéptido ST de la LPT2 se mantienen después de pasar por el sistema digestivo. Por lo que comprobaremos si es posible liberarlos mediante la proteólisis con proteinasa K [76]. Los péptidos resultantes tras la digestión son: DSKMKPCL y RST, por lo que no son efectivos en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, como ocurriría con los péptidos producidos al degradar la proteína z, estos péptidos serán degradados por las enzimas digestivas, pudiendo liberar péptidos inhibidores de la ACE en el aparato digestivo. La actividad hipotensora del producto no puede ser establecida mediante la realización de estudios *in silico*, sino que deberá ser comprobada en el laboratorio.

3. CONCLUSIONES

Como resultado de este proyecto se ha conseguido un dataset de péptidos inhibidores de la ACE con una concentración IC50 (a la cual el 50% de la actividad de la enzima se encuentra inhibida) igual o menores a 20 μM (adjunto al trabajo).

Además, se puede concluir que la producción de una cerveza que contenga péptidos inhibidores de la ACE es en principio viable. El producto contendría el dipéptido Ser-Ter, el cual ha sido demostrado que interacciona con la proteína. Sin embargo, al estar estudiando un producto complejo, una prueba de confirmación en el laboratorio sigue siendo necesaria.

A pesar de que la estrategia en principio ha tenido que ser redefinida en múltiples ocasiones, el objetivo del proyecto se ha logrado. Por lo tanto, creo que a la hora de planificar un proyecto como este es importante establecer un tiempo de margen para posibles cosas que salgan mal y tanto un tiempo previo para recolectar información como un tiempo al final para recopilar todos los datos y análisis.

4. GLOSARIO

Alimento funcional: alimentos diseñados no sólo por sus características nutricionales sino para además mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades de los consumidores.

Endoproteasa: enzima que corta la cadena peptídica, generalmente en posiciones determinadas.

Enzima convertidora de angiotensina (ACE): es el componente central del sistema renina-angiotensina, el cual controla la presión sanguínea mediante la regulación del volumen de fluidos en el cuerpo.

LTPs: acrónimo de las proteínas transferidoras de lípidos, del inglés lipid transfer proteins.

Péptido inhibidor: pequeña secuencia de aminoácidos capaz de inactivar o dificultar la actividad de una enzima en particular.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Rahimi, K., C.A. Emdin, and S. MacMahon, *The Epidemiology of Blood Pressure and Its Worldwide Management*. Circulation Research, 2015. **116**(6): p. 925-936.
2. Salud, O.n.M.d.l. *Causas de muerte 2008 [base de datos en línea]*. 2008 Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf.
3. Salud, O.m.d.l., 2015.
4. Salud, O.n.M.d.l., *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010*. 2011.
5. Lewington, S., et al., *Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies*. Lancet, 2002. **360**(9349): p. 1903-13.
6. *The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure*. Arch Intern Med, 1997. **157**(21): p. 2413-46.
7. Sesso, H.D., et al., *Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 1080-7.
8. Rimm, E.B., et al., *Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men*. Lancet, 1991. **338**(8765): p. 464-8.
9. Arranz, S., et al., *Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer*. Nutrients, 2012. **4**(7): p. 759-81.
10. Durante, A., et al., *Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(7): p. 981-1004.
11. Laffan, R.J., et al., *Antihypertensive activity in rats for SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I-converting enzyme*. J Pharmacol Exp Ther, 1978. **204**(2): p. 281-8.
12. Skeggs, L.T., Jr., J.R. Kahn, and N.P. Shumway, *The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme*. J Exp Med, 1956. **103**(3): p. 295-9.
13. Yusuf, S., et al., *Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 145-53.
14. Greene, L.J., J.M. Stewart, and S.H. Ferreira, *Bradykinin-Potentiating Peptides from the Venom of Bothrops Jararaca*, in *Bradykinin and Related Kinins: Cardiovascular, Biochemical, and Neural Actions*, F. Sicuteri, M.R. e Silva, and N. Back, Editors. 1970, Springer US: Boston, MA. p. 81-87.
15. Yamamoto, N., *Antihypertensive peptides derived from food proteins*. Biopolymers, 1997. **43**(2): p. 129-34.
16. FitzGerald, R.J. and H. Meisel, *Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S33-7.
17. Pihlanto-Leppälä, A., *Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides*. Trends in Food Science & Technology, 2000. **11**(9-10): p. 347-356.
18. Yamamoto, N., M. Ejiri, and S. Mizuno, *Biogenic peptides and their potential use*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(16): p. 1345-55.
19. Ondetti, M.A. and D.W. Cushman, *Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 283-308.
20. Cheung, H.S., et al., *Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence*. J Biol Chem, 1980. **255**(2): p. 401-7.

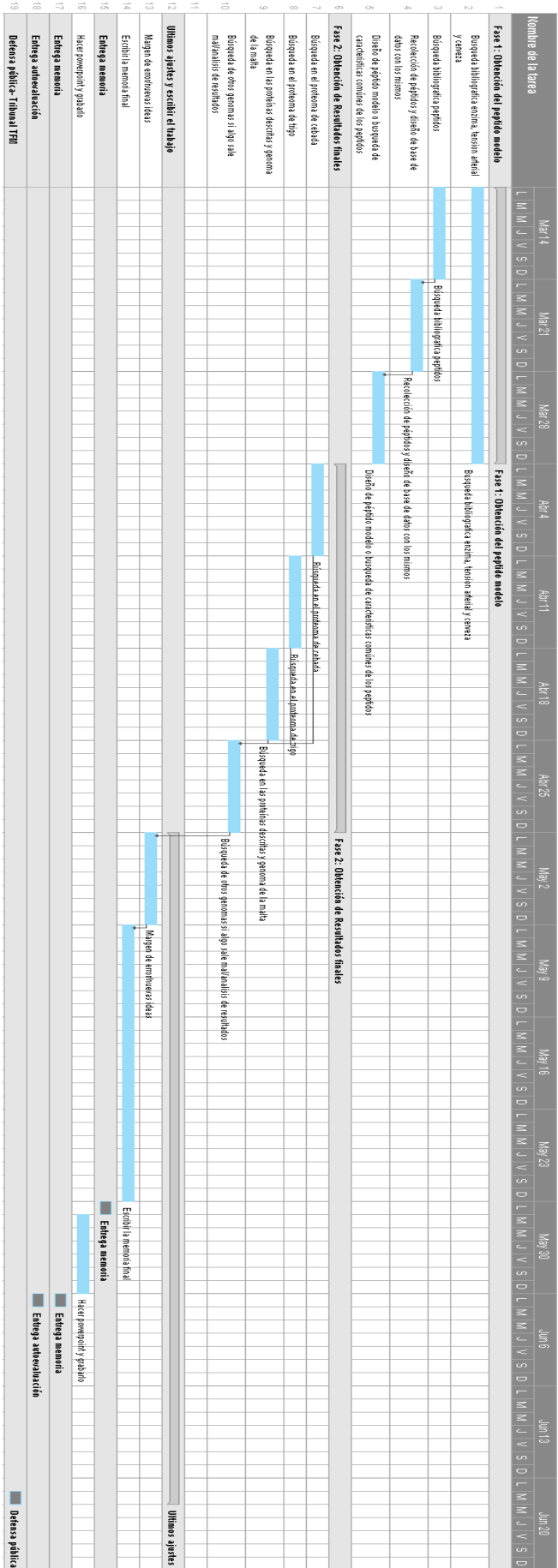
21. Erdos, E.G., *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. Am J Med, 1976. **60**(6): p. 749-59.
22. Cushman, D.W., et al., *Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids*. Biochemistry, 1977. **16**(25): p. 5484-91.
23. *Functional Food Science in Europe.*, B.J.o. Nutrition, Editor. 1998.
24. De Leo, F., et al., *Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(31): p. 3622-43.
25. Pulido, R., M. Hernandez-Garcia, and F. Saura-Calixto, *Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet*. Eur J Clin Nutr, 2003. **57**(10): p. 1275-82.
26. Perrocheau, L., et al., *Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer*. Proteomics, 2005. **5**(11): p. 2849-58.
27. Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete, *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 357-66.
28. Maehashi, K. and L. Huang, *Bitter peptides and bitter taste receptors*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1661-71.
29. Cha, M. and J.R. Park, *Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate*. J Med Food, 2005. **8**(3): p. 305-10.
30. Li, C.H., et al., *Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein*. J Pept Sci, 2002. **8**(6): p. 267-74.
31. Saito, T., et al., *Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese*. J Dairy Sci, 2000. **83**(7): p. 1434-40.
32. Murray, B.A. and R.J. FitzGerald, *Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(8): p. 773-91.
33. Matsui, T., C.H. Li, and Y. Osajima, *Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ*. J Pept Sci, 1999. **5**(7): p. 289-97.
34. FitzGerald, R.J., B.A. Murray, and D.J. Walsh, *Hypotensive peptides from milk proteins*. J Nutr, 2004. **134**(4): p. 980S-8S.
35. Wu, J., R.E. Aluko, and S. Nakai, *Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(3): p. 732-8.
36. Hernandez-Ledesma, B., M. del Mar Contreras, and I. Recio, *Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods*. Adv Colloid Interface Sci, 2011. **165**(1): p. 23-35.
37. Lee, S.J., et al., *Purification and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from an enzymatic hydrolysate of duck skin byproducts*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(40): p. 10035-40.
38. Lei, L., et al., *Transport of Val-Leu-Pro-Val-Pro in human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(10): p. 3582-6.
39. Rawendra, R.D., et al., *Isolation and characterization of a novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory tripeptide from enzymatic hydrolysis of soft-shelled turtle (Pelodiscus sinensis) egg white: in vitro, in vivo, and in silico study*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(50): p. 12178-85.
40. Duan, X., et al., *Naturally occurring angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from a fertilized egg and its inhibitory mechanism*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(24): p. 5500-6.
41. Terashima, M., et al., *Novel angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from boneless chicken leg meat*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(12): p. 7432-6.

42. Mallikarjun Gouda, K.G., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (Glycine max)*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(13): p. 4568-73.
43. He, H.L., D. Liu, and C.B. Ma, *Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins*. Appl Biochem Biotechnol, 2013. **169**(3): p. 738-49.
44. Chen, Y., et al., *Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk*. J Dairy Sci, 2010. **93**(3): p. 884-92.
45. Zhao, H., et al., *Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D(2)-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats*. Peptides, 2008. **29**(3): p. 345-9.
46. Jimsheena, V.K. and L.R. Gowda, *Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: structure-activity relationship*. Peptides, 2010. **31**(6): p. 1165-76.
47. Balti, R., et al., *Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (Sepia officinalis) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats*. Food Chem, 2015. **170**: p. 519-25.
48. Nakamura, Y., et al., *Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk*. J Dairy Sci, 1995. **78**(4): p. 777-83.
49. Contreras, M.d.M., et al., *Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion*. International Dairy Journal, 2013. **32**(2): p. 71-78.
50. Quirós, A., et al., *Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties*. Peptides, 2009. **30**(10): p. 1848-1853.
51. Suetsuna, K., *Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga Porphyra yezoensis*. J Mar Biotechnol, 1998. **6**(3): p. 163-7.
52. Zou, P., et al., *Purification, identification, and in vivo activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, from ribbonfish (Trichiurus haumela) backbone*. J Food Sci, 2014. **79**(1): p. C1-7.
53. Saito, Y., et al., *Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees*. Biosci Biotechnol Biochem, 1994. **58**(10): p. 1767-71.
54. Wu, J. and X. Ding, *Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides*. Food Research International, 2002. **35**(4): p. 367-375.
55. Miyoshi, S., et al., *Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate*. Agric Biol Chem, 1991. **55**(5): p. 1313-8.
56. Matsumura, N., et al., *Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels*. Biosci Biotechnol Biochem, 1993. **57**(10): p. 1743-4.
57. Fujita, H. and M. Yoshikawa, *LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein*. Immunopharmacology, 1999. **44**(1-2): p. 123-7.
58. Ben Henda, Y., et al., *Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(45): p. 10685-90.
59. Tsai, J.S., et al., *The inhibitory effects of freshwater clam (Corbicula fluminea, Muller) muscle protein hydrolysates on angiotensin I converting enzyme*. Process Biochemistry, 2006. **41**(11): p. 2276-2281.
60. Kim, S.K., et al., *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(6): p. 2992-7.

61. Shin, Z.I., et al., *His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(6): p. 3004-9.
62. Lee, J.K., et al., *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide extracted from freshwater zooplankton*. J Med Food, 2010. **13**(2): p. 357-63.
63. Gomez-Ruiz, J.A., M. Ramos, and I. Recio, *Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques*. Electrophoresis, 2007. **28**(22): p. 4202-11.
64. Lu, Y., S. Govindasamy-Lucey, and J.A. Lucey, *Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages*. J Dairy Sci, 2016. **99**(1): p. 41-52.
65. Ohishi, M., K. Yamamoto, and H. Rakugi, *Angiotensin (1-7) and other angiotensin peptides*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(17): p. 3060-4.
66. Suetsuna, K. and J.R. Chen, *Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, Chlorella vulgaris and Spirulina platensis*. Mar Biotechnol (NY), 2001. **3**(4): p. 305-9.
67. NCBI. *BLAST*. 2016; Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.
68. Johnson, M., et al., *NCBI BLAST: a better web interface*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W5-9.
69. UCSC. *BLAT*. 2016; Available from: <https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>.
70. Kent, W.J., *BLAT--the BLAST-like alignment tool*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 656-64.
71. Priyam A, W.B., Rai V, Wurm Y, *SequenceServer: BLAST search made easy*. 2016.
72. ExPASy, *BLAST*. 2016.
73. EMBL-EBI. *FASTM*. 2016; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastm/>.
74. Emboss. *Wordmatch*. 2016; Available from: <http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>.
75. NCBI. *Protein*. 2016; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
76. ExPASy, *PeptideCutter*. 2016.
77. Wang, Y.-K., et al., *Production of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides by fermentation of marine shrimp Acetes chinensis with Lactobacillus fermentum SM 605*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **79**(5): p. 785-791.
78. SIB. *SwissDock*. 2016; Available from: <http://www.swissdock.ch/docking>.
79. Jmol. *Peptide helix builder* 2016; Available from: http://biomodel.uah.es/Jmol/helix_builder/inicio.htm?use=HTML5.
80. Hanwell, M.D., et al., *Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform*. J Cheminform, 2012. **4**(1): p. 17.
81. *Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool*. 2016; Available from: <http://avogadro.openmolecules.net/>.

6. ANEXOS

ANEXO 1. PLANIFICACIÓN



ANEXO 2. PEPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE.

> Matsui et al. (1999)

AF

> Cheung et al. (1980)

AW

> De Leo et al. (2009)

AY

> Hai-Lun et al. (2013)

CF

> De Leo et al. (2009)

DG

> Wu et al. (2006)

DF

> Hai-Lun et al. (2013)

FE

> De Leo et al. (2009)

FL

> Wu et al. (2006)

FW

> Suestsuna (1998)

FY

> Hai-Lun et al. (2013)

EY

> Cheung et al. (1980)

IW

> Cheung et al. (1980)

IY

> Wu et al. (2006)

KP

> Wu et al. (2006)

KW

> Wu et al. (2006)

KY

> Bree et al. (2006)

LW

> Wu et al. (2006)

LY

> Wu et al. (2006)

MF

> Wu et al. (2006)

MW

> Saito et al. (1994)

PR

> Wu et al. (2006)

RW

> De Leo et al. (2009)

RY

> Hai-Lun et al. (2013)

ST

> De Leo et al. (2009)

TF

> Matsui et al. (1999)

VF

> De Leo et al. (2009)

VK

> Cheung et al. (1980)

VW

> Saito et al. (1980)

VY

> Wu et al. (2006)

YH

> De Leo et al. (2009)

YL

> Wu et al. (2006)

YW

> Wu et al. (2006)

AKK

> Wu et al. (2006)

AVL

> Wu et al. (2006)

DGL

> Wu and Ding (2002)

DLP

> Yamamoto (1997)

FAP

> Wu et al. (2006)

FEP

> Hernández-Ledesma et al. (2007)

FQP

> Wu et al. (2006)

FNF

> Wu et al. (2006)

FYN

> Saito et al. (1994)

GGY

> Wu et al. (2006)

GKV

> Wu et al. (2006)

GQP

> De Leo et al. (2009)

GLP

> Wu et al. (2006)

GLY

> Byun and Kim (2001)

GPL

> Wu et al. (2006)

GPM

> De Leo et al. (2009)

GPP

> Kim et al. (2001)

GPV

> Wu et al. (2006)

GRP

> Hai-Lun et al. (2013)

GTG

> Shin et al. (2001)

HHL

> Hernández-Ledesma et al. (2011)

IAK

> De Leo et al. (2009)

IAP

> Wu et al. (2006)

IAY

> Jimsheena et al. (2010)

IEP

> Matsumura et al. (1993)

IKP

> Fujita et al. (1999)

IKW

> Wu et al. (2006)

IKY

> Wu et al. (2006)

IMY

> Duan et al. (2014)

IQW

> Nakaruma and Yamamoto (1995)

IPP

> Miyoshi et al. (1991)

IRA

> Matsumura et al. (1993)

IRP

> Duan et al. (2014)

IRW

> Reynetha e al. (2014)

IVR

> Matsui et al. (1999)

IVY

> Fujita and Yoshikawa et al. (1999)

IWH

> Wu et al. (2006)

LAA

> Wu et al. (2006)

LAP

> Miyoshi et al. (1991)

LAY

> Wu et al. (2006)

LEP

> De Leo et al. (2009)

LGP

> Wu et al. (2006)

LIY

> Fujita and Yoshikawa et al. (1999)

LKP

> Wu et al. (2006)

LLP

> Yamamoto (1997)

LPP

> Miyoshi et al. (1991)

LQP

> Miyoshi et al. (1991)

LRP

> Wu et al. (2006)

LRW

> Wu et al. (2006)

LRY

> Miyoshi et al. (1991)

LSP

> Wu et al. (2006)

LTF

> Jung Kwon Lee (2010)

LVE

> Wu et al. (2006)

LVQ

> Wu et al. (2006)

LVL

> De Leo et al. (2009)

LVR

> Wu et al. (2006)

LWA

> Yamamoto (1997)

LYP

> Hai-Lun et al. (2013)

MAW

> Wu et al. (2006)

MKY

> De Leo et al. (2009)

MPP

> Wu et al. (2006)

MRW

> De Leo et al. (2009)

PSY

> Saito et al. (1994)

PRY

> Wu et al. (2006)

SVY

> Wu et al. (2006)

TAP

> Wu et al. (2006)

TKY

> De Leo et al. (2009)

TVY

> Yamamoto (1997)

VAP

> Hai-Lun et al. (2013)

VIF

> Wu et al. (2006)

VIY

> Jung Kwon Lee (2010)

VKP

> Wu et al. (2006)

VLP

> Nakaruma and Yamamoto (1995)

VPP

> Wu et al. (2006)

VQV

> Matsumura et al. (1993)

VRP

> Miyoshi et al. (1991)

VSP

> Saito et al. (1994)

VWY

> Wu et al. (2006)

Y EY

> Wu et al. (2006)

YPR

> Li et al. (2002)

YQY

> Wu et al. (2006)

YVA

> Hai-Lun et al. (2013)

AHSY

> Yamamoto (1997)

FVAP

> Hai-Lun et al. (2013)

GWAP

> Jung Kwon Lee et al. (2010)

IAPG

> Saito et al. (1994)

IYPR

> De Leo et al. (2009)

TAPY

> De Leo et al. (2009)

TVPY

> Matsui et al. (1999)

VFPS

> Hai-Lun et al. (2013)

VIIF

> Hai-Lun et al. (2013)

VYAP

> Saito et al. (1994)

YGGY

> Hernández-Ledesma et al. (2007)

ALPHA

> De Leo et al. (2009)

FFVAP

> Hernández-Ledesma et al. (2007)

LKPNM

> De Leo et al. (2009)

LYPVK

> R. Balti et al. (2015)

VELYP

> De Leo et al. (2009)

AVNPIR

> De Leo et al. (2009)

AYFYPE

> De Leo et al. (2009)

DIGYY

> De Leo et al. (2009)

DYVPG

> Gouda et al. (2006)

VLIVP

> Lei et al. (2008)

VLPVP

> Hai-Lun et al. (2013)

IFVPAF

> De Leo et al. (2009)

FALPQY

> Hai-Lun et al. (2013)

FCVLRP

> Hai-Lun et al. (2013)

IWHHT

> Contreras et al. (2013)

RYLGY

> De Leo et al. (2009)

TTMPLW

> De Leo et al. (2009)

TVVPG

> De Leo et al. (2009)

AVPYPQR

> De Leo et al. (2009)

FPQYLQY

> De Leo et al. (2009)

GGVIPN

> Hernández-Ledesma et al. (2011)

KVLPVP

> Duan et al. (2014)

KVREGT

> Hernández-Ledesma et al. (2011)

PYVRYL

> R. Balti et al. (2015)

STHGWW

> Quirós et al. (2009)

LHLPLP

> Hernández-Ledesma et al. (2011)

YAKPVA

> Gouda et al. (2006)

YLAGRQ

> R. Balti et al. (2015)

AFVGYVLP

> De Leo et al. (2009)

APGAGVY

> Contreras et al.(2013)

AYFYPEL

> R. Balti et al. (2015)

EKSYELP

> Chen et al. (2010)

LLLAHLL

> Chen et al. (2010)

PKDLREN

> Hai-Lun et al. (2013)

PTHIKWGD

> De Leo et al. (2009)

ALKAWSVAR

> ZHONG-JI QIAN (2007)

IVGRPRHEE

> Hai-Lun et al. (2013)

IVGRPRHEE

> De Leo et al. (2009)

RPKHPIKHQ

> Terashima et al. (2010)

VTVNPYKWLP

> LU et al. (2016)

YPFPGIPN

> Hai-Lun et al. (2013)

EVMAGNLYPG

> Hai-Lun et al. (2013)

MEGAQEAQGD

> De Leo et al. (2009)

FFVAPFPEVFGK

> Hai-Lun et al. (2013)

HERDPTHIKWGD

> Chen et al. (2010)

NHRNRMMDHVH

> Gómez-Ruiz et al. (2007)

WQVLPNAVPAK

> De Leo et al. (2009)

LVYPPGPIPNSLPQNIPP

> Chen et al. (2010)

YQDPRLGPTGELDPATQPIVAVHNPVIV