



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada



Maestría en Biotecnología Aplicada

**Producción de péptidos bioactivos de proteína de chía (*Salvia
hispanica L.*) por medio de *Lactobacillus sp.***

Presenta

I.P.A Edgar Salazar Bautista

Directora de tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

Comité tutorial

Dra. Claudia Castro Martínez

Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas

Dra. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Dr. Víctor Eric López Y López

Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 10 de marzo del 2017

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA en su sesión ordinaria No. 3 celebrada el día 10 del mes de marzo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Salazar
Apellido paterno

Bautista
Apellido materno

Edgar
Nombre (s)

Con registro:

B	1	6	0	5	5	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Producción de péptidos bioactivos de proteína de chíá (*Salvia Hispanica L.*) por medio de *Lactobacillus sp.*

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Obtención de un aislado proteico a partir de semilla de chíá

Fermentación del aislado proteico con *Lactobacillus sp.*

Cuantificación de actividad biológica de los péptidos obtenidos

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:

Dra. Silvia Luna Suárez

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Centro de Investigación en Biotecnología aplicada.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director(a) de Tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

Aspirante

Edgar Salazar Bautista

Presidente del Colegio

Dra. Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlax. siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de enero del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:
Producción de péptidos bioactivos de proteína de chíá (*Salvia hispanica L.*) por medio de *Lactobacillus sp.*

Presentada por el alumno:

Salazar
Apellido paterno

Bautista
Apellido materno

Edgar
Nombre(s)

Con registro:

B	1	6	0	5	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas

Dr. Víctor Eric López y López

Dr. Raul J. Delgado Macuil

Dra. Claudia Castro Martínez

Dr. Fernando López Valdez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Secretaría de Investigación y Posgrado
Unidad de Investigación Aplicada
Tlaxcala



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 7 del mes de enero del año 2019, el (la) que suscribe Edgar Salazar Bautista alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Aplicada con número de registro B160557, adscrito a CIBA, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Silvia Luna Suarez y cede los derechos del trabajo intitulado Producción de péptidos bioactivos de proteína de chía (*Salvia hispanica L.*) por medio de *Lactobacillus sp.*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección edgarsalzar.92@gmail.com, o bien silvials2004@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Edgar Salazar Bautista

Nombre y firma

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada para cursar el posgrado.

Al Instituto Politécnica Nacional por abrirme sus puertas y el apoyo económico otorgado en la fase final de la maestría.

A la Doctora Silvia Luna por su apoyo y asesorías no solo en el ámbito escolar, es un ejemplo a seguir como persona y como profesionista.

Al comité tutorial y cuerpo académico del CIBA-IPN por la formación académica, observaciones y cuestionamientos acerca del proyecto tan necesarias para el mejoramiento del mismo.

Dedicatorias

A mi familia, lo más importante en mi vida y la mayor motivación para seguir mejorando como persona.

Resumen

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), el objetivo fue la obtención de hidrolizados con actividad antioxidante y antihipertensiva a partir de la proteína de la semilla de chía (*Salvia hispánica L.*) liberados por la fermentación de *Lactobacillus*. A las 24 horas se obtuvieron hidrolizados con *in vitro* buena actividad antioxidante y antihipertensiva, estos fueron ultrafiltrados con membranas de 3 kDa aumentando la eficacia de estos, siendo su IC50 para DPPH 34.23 µg/ml, para ABTS 14.7 µg/ml, para la quelación del ion Fe 3.2 µg/ml, y la inhibición completa de la enzima convertidora de angiotensina-I. La chía es una fuente de péptidos antioxidantes y antihipertensivos que pueden ser empleados para el tratamiento y prevención de enfermedades provocadas por el estrés oxidativo, así como la hipertensión.

Abstract

The present work was carried out in the Research Center in Applied Biotechnology (CIBA-IPN), the aim was to obtain hydrolysates with antioxidant and antihypertensive activity from the chia seed protein (*Salvia hispánica L.*) released by the *Lactobacillus* fermentation. After 24 hours, hydrolysates were obtained with good anti-oxidant and antihypertensive activity in vitro, they were ultrafiltered with 3 kDa membranes increasing their efficacy, with IC₅₀ for DPPH 34.23 µg / ml, for ABTS 14.7 µg / ml, for chelation of the Fe 3.2 µg / ml ion, and the complete inhibition of the angiotensin-I converting enzyme. Chia is a source of antioxidant and antihypertensive peptides that can be used for the treatment and prevention of diseases caused by oxidative stress as well as hypertension.

Contenido

1. Introducción.....	14
2. Marco teórico.....	15
2.1 Chía (<i>Salvia hispanica L.</i>).....	15
2.1.1 Condiciones agronómicas del cultivo	15
2.1.2 Producción	16
2.1.3 Composición proximal	16
2.2 Proteínas	16
2.2.1 Proteínas de reserva	17
2.3 Péptidos bioactivos.....	17
2.3.1 Péptidos antioxidantes	18
2.3.2 Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I (Antihipertensivos)	18
2.3.3 Producción de péptidos bioactivos	19
2.4 Bacterias ácido lácticas y su sistema proteolítico	20
2.4.1 <i>Lactobacillus sp.</i>	20
3. Antecedentes	22
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos	23
6.1 Objetivo General.....	23
6.2 Objetivos específicos	23
7. Metodología.....	24
7.1 Obtención de concentrado de proteína de chía	24
7.1.1 Desmucilaginado de la semilla	24
7.1.2 Escalamiento de extracción de mucílago	24
7.1.3 Capacidad de retención de agua (CRA).....	25
7.1.4 Desgrasado de la semilla.....	25
7.1.5 Determinación de contenido proteico.....	25
7.1.6 Determinación de carbohidratos totales.....	26
7.1.7 Determinación de carbohidratos reductores	26

7.1.8 Determinación de grasas	26
7.1.9 Determinación de cenizas.....	26
7.2 Aislamiento de <i>Lactobacillus</i>	27
7.2.1 Conservación de las cepas.	27
7.2.2 Determinación de actividad proteolítica de las cepas	27
7.2.3 Cuantificación de actividad proteolítica (Método de Kunitz)	28
7.2.4 Tinción de Gram.....	28
7.3 Hidrólisis del concentrado de proteína de chía por <i>Lactobacillus sp.</i>	28
7.3.1 Formulación del medio	28
7.3.2 Medición de actividad biológica	29
7.3.2.1 Capacidad captadora del radical DPPH• (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo) 29	
7.3.2.2 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)	30
7.3.2.3 Quelación del ion Fe	30
7.3.2.4 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina.....	31
7.4 Ultrafiltración y evaluación del hidrolizado con mejores actividades biológicas	31
7.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	31
7.5 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE	32
7.6 Electroforesis 2D.....	32
7.6 Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus sp.</i>	32
7.7 Análisis estadístico.....	33
8. Resultados y discusión.....	34
8.1 Obtención de concentrado de proteína de chía	34
8.1.1 Desmucilaginado de la semilla	34
8.1.2 Desgrasado parcial de la semilla	37
8.1.3 Determinación de proteína de la semilla de chía.....	37
8.1.4 Determinación de carbohidratos totales	37
8.1.5 Determinación de cenizas	37
8.2 Aislamiento de <i>Lactobacillus</i>	37
8.2.1 Determinación de actividad proteolítica.....	38
8.2.2 Cuantificación de actividad proteolítica (Método de Kunitz)	39

8.2.3 Tinción de Gram.....	39
8.3 Fermentación de proteína de chía por <i>Lactobacillus sp.</i>	40
8.7 Cinética de crecimiento bacteriano	40
8.3.1 Cuantificación de proteína.....	41
8.3.2 Cuantificación de carbohidratos	42
8.3.2 Determinación de actividad antioxidante	43
8.3.2.1 DPPH.....	43
8.3.2.2 ABTS.....	44
8.3.2.4 Quelación del ión Fe	45
7.3.2.4 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina.....	46
8.3.3 Ultrafiltración y evaluación del hidrolizado con mejores actividades biológicas	47
8.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	48
8.5 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE	49
8.6 Electroforesis 2D	50
9. Conclusiones.....	52
10. Bibliografía	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidad de retención de agua de las semillas tratadas	34
Figura 2. Capacidad de retención de agua en el escalamiento del proceso.	36
Figura 3. Colonias seleccionadas para pruebas de hidrolisis.....	38
Figura 4. Prueba de agar-caseína practicada a las cepas 1,2 y 3.....	38
Figura 5. Observación bajo el microscopio de la Cepa 3 bajo el objetivo 10x.....	40
Figura 6. Cinética de crecimiento bacteriano	41
Figura 7. Proteína soluble de las muestras	42
Figura 8. Carbohidratos contenidos en los hidrolizados	42
Figura 9. IC50 en la prueba DPPH de los hidrolizados	43
Figura 10. IC50 en la prueba ABTS de los hidrolizados.....	44
Figura 11. IC50 en la prueba de Quelación de ion Fe de los hidrolizados	45
Figura 12. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina.....	46
Figura 13. SDS-PAGE en condiciones reductoras, carril 1 marcador Page Ruler, carril 2 proteínas sin hidrolizar, carril 3 12 horas de fermentación, carril 4 18 horas de fermentación, carril 5 24 horas de fermentación, carril 6 30 horas de fermentación, carril 7 34	48
Figura 14. Tricine-SDS-PAGE, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 proteínas sin hidrolizar, carril 3 12 horas de fermentación, carril 4 18 horas de fermentación, carril 5 24 horas de fermentación, carril 6 30 horas de fermentación, carril 7 34 horas de fermentación.	49
Figura 15. Gel de acrilamida de 2 dimensiones (2D-PAGE) de péptidos obtenidos a las 24 horas de fermentación.	50
Figura 16. Gel de acrilamida de 2 dimensiones (2D-PAGE) de los péptidos obtenidos con 24 horas de fermentación menores a 3 kDa.	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos planteados para la extracción de mucílago de chía.....	24
Tabla 2. Actividad proteolítica de las cepas aisladas	39
Tabla 3. IC50 para la actividad antioxidante de los ultrafiltrados.....	47

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. IC50 de las muestras.....	29
---------------------------------------	----

1. Introducción

Los péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Meisel, 1998). Las actividades biológicas más estudiadas de péptidos son la antioxidante y la antihipertensiva debido a su importancia ya que las especies reactivas de oxígeno son radicales libres o precursores de radicales que tienen un electrón desapareado que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (Segura y col., 2013), este daño ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, y con el proceso de envejecimiento (Chirino y col., 2006) y en los alimentos como responsables de la oxidación y rancidez de alimentos; de igual manera la hipertensión arterial (HTA) es considerada actualmente como la enfermedad crónica más frecuente del mundo, se estima que hasta el 25% de la población la padece, en México, la HTA sistémica es un grave problema de salud pública (López y Carranza, 2011).

La semilla de chía contiene de 15 - 24% de proteína (Ayerza y Coates, 2005), siendo una fuente subutilizada de proteína y por ende de potenciales péptidos bioactivos, el objetivo de este trabajo fue la obtención de estos péptidos por hidrólisis con *Lactobacillus sp.* y su evaluación *in vitro* de su capacidad antioxidante y antihipertensiva.

2. Marco teórico

2.1 Chía (*Salvia hispanica L.*)

La chía es un cereal que pertenece a la familia *Labiatae* que comprende aproximadamente 512 especies en todo el país (Hernández, 1994). Destacan dos géneros: *Hyptis* y *Salvia*, de esta última sobresale *Salvia hispanica L.* que es la variedad comercial en el país (Domínguez y col., 2002). Es originaria de Mesoamérica y la mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico, desde el centro de México hasta el norte de Guatemala. (Miranda, 1978; Cahill, 2004).

La planta tiene una altura entre un 1,0 y 1,5 metros, y sus tallos son ramificados, de sección cuadrangular con pubescencias cortas y blancas. Las hojas opuestas con bordes aserrados miden de 80 a 100 cm de longitud, y 40 a 60 mm de ancho. Sus flores de color azul intenso o blancas se producen en espigas terminales. Las semillas son ovales, suaves, brillantes y miden entre 1,5 y 2,0 mm de longitud. Según la variedad, su color puede ser blanco o negro grisáceo con manchas irregulares que tienden a un color rojo oscuro (Ayerza y Coates, 2006).

2.1.1 Condiciones agronómicas del cultivo

La chía es un cultivo que crece en condiciones tropicales y subtropicales y no es tolerante a las heladas (Ayerza y Coates, 2006).

Prefiere suelos ligeros a medios, bien drenados, no demasiado húmedos; como la mayoría de las *salvias*, es tolerante respecto a la acidez y a la sequía, pero no soporta las heladas. Requiere abundante sol, y no fructifica en la sombra. (<http://www.oeidrus-jalisco.gob.mx/>)

2.1.2 Producción

De acuerdo con el ministerio de asuntos exteriores de los Países Bajos, en el 2014 Argentina fue el mayor productor de la semilla con 40,000 toneladas, mientras que México se colocó como el tercer lugar con 25,000 toneladas.

2.1.3 Composición proximal

El contenido nutricional de la chía es de 25 a 40% de carbohidratos, de 25 al 40% de grasas y 15-24% de proteínas (Ayerza, 2009; Ayerza y Coates, 2004; Olivos y col., 2010; Sandoval y Paredes, 2013), que destaca en comparación con otros pseudocereales como la quínoa que es de 4.5% y cereales como el trigo que contiene 8%(Latham, 2002).

2.2 Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales en las que las unidades monoméricas que lo constituyen son los aminoácidos, que se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporcionan una correspondiente variedad de funciones (Teijón y col., 2001).

Pueden constituir 50% o más del peso seco de las células vivas. Desempeñan un papel central en los sistemas biológicos. Abarcan todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas (Badui, 1996).

Son la principal fuente exógena de aminoácidos por lo que las proteínas cuyos contenidos de aminoácidos se aproximan al punto óptimo de satisfacción de las necesidades animales, son consideradas de alta calidad. Por lo tanto, la calidad está en función del valor nutricional de una proteína y esté a su vez está definido por el contenido, disponibilidad y balance de aminoácidos esenciales (Aufrère y col., 1992).

2.2.1 Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva son especialmente importantes en alimentación humana debido a que determinan el contenido de proteína total en las semillas, así como también la calidad nutricional y las propiedades funcionales de los alimentos derivados de estos granos (Argos y col., 1985). La cantidad de proteínas en semillas varía desde un 10% del peso seco en cereales hasta un 40% en leguminosas y oleaginosas (Shewry y Harlfod, 2002). Se sintetizan y acumulan durante la etapa media del desarrollo del grano y se almacenan en grandes cantidades en forma de agregados subcelulares llamados “cuerpos proteicos” hasta que se hidrolizan durante la maduración y germinación de la semilla. Estas proteínas son la principal fuente de nitrógeno y energía para las semillas y el fruto durante el crecimiento reproductivo y la rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia y durante la germinación (Casey y Domoney, 1984).

2.3 Péptidos bioactivos

Un péptido es una cadena de aminoácidos unido mediante enlaces amida de forma similar a como lo hacen en las proteínas, pero con un número menor de aminoácidos menor que en estas (<100 aminoácidos) (Jiménez y col, 2004).

Se ha demostrado que las proteínas y los péptidos derivados de ellas exhiben una serie de actividades biológicas con efecto directo sobre procesos fisiológicos del organismo, más allá de su aporte nutrimental (Iwaniak y Minkiewicz, 2007). Estas secuencias aminoacídicas tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización (Vermeirissen y col, 2004).

Numerosas bioactividades han sido descritas para péptidos incluyendo propiedades opiáceas, antitrombóticas, antihipertensivas, inmunomoduladoras, antilipémicas, osteoprotectoras, antioxidantes, antimicrobianas, anticariogénicas y promotoras del crecimiento. Los péptidos pueden tener uno o más efectos biológicos diferentes.

2.3.1 Péptidos antioxidantes

Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especie moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (Segura, M; Chel, L & Betencour, D, 2013).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas (Vertuani, Angusti y Manfredini, 2004). Una producción excesiva de ROS puede sobrepasar la capacidad antioxidante fisiológica. Como consecuencia de este daño oxidativo, las proteínas, los lípidos y el ADN se convierten en el blanco de ataque de los radicales libres, dañando las enzimas, las membranas celulares y el material genético (Segura, M; Chel, L & Betencour, D, 2013).

Los péptidos antioxidantes actúan como inhibidores de la peroxidación de lípidos, secuestradores directos de radicales libres y / o como agentes para quelar iones metálicos de transición que catalizan la generación de especies radicales (Shimada, Fujikawa, Yahara y Nakamura, 1992). Normalmente, los péptidos antioxidantes están constituidos por residuos de 2-20 aminoácidos y tienen masas moleculares inferiores a 6,0 kDa (Coda *et al.*, 2012). asimismo, a menudo incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos como Val o Leu en el amino terminal, así como Pro, His, Tir, Trp, Met y Cis en sus secuencias. (Saito y col., 2003)

2.3.2 Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I (Antihipertensivos)

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) tiene un papel primordial en la regulación de la presión sanguínea, actúa hidrolizando el decapeptido Angiotensina-1 para producir Angiotensina-II que es un vasoconstrictor y por otro lado degrada el péptido vasodilatador bradiquidina (Sknow, Smith, 2003). Los tratamientos de

primera línea son inhibidores competitivos de la enzima, como el captopril, sin embargo los inhibidores sintéticos de la ECA tienen multitud de efectos secundarios como hipotensión, altos niveles de potasio, función renal reducida, tos, angiodema, erupciones cutáneas y anormalidades fetales (Abbenate, 2005), es por eso que se ha buscado una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad sin los efectos secundarios mencionados, números estudios han encontrado péptidos con la capacidad de inhibir la ECA los cuales son generalmente de pequeño tamaño y pueden ser absorbidos fácil y rápidamente en el intestino e inhibir la enzima convertidora, lo que generaría una baja de la presión arterial; si bien tienen una actividad inhibidora *in vitro* menor que los fármacos inhibidores, hasta el momento no se han demostrado ningún efecto secundario (Korhonen y Pihlanto, 2003).

2.3.3 Producción de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos pueden ser generados de la proteína precursora de múltiples maneras, que incluyen:

Digestión gastrointestinal *in vivo*. La digestión *in vivo* de las proteínas comienza en el estómago bajo la acción de la pepsina, además la secreción de ácido a nivel gástrico disminuye el pH, lo que contribuye a la digestión de las proteínas. El quimo es gradualmente desplazado al intestino delgado donde el pH del estómago es neutralizado y se incorporan jugos digestivos pancreáticos (con enzimas digestivas como la tripsina y la quimotripsina) y de la vesícula biliar (ácidos biliares). Las enzimas digestivas secretadas catalizan la hidrólisis de las proteínas, los lípidos y el almidón, mientras que los ácidos biliares ayudan a emulsionar los productos resultantes de la digestión de los lípidos en micelas (Withney y Rolfes, 2008; Wickham y col., 2009)

Hidrólisis *in vitro* por acción de enzimas digestivas, proteolíticas u otras enzimas derivadas de microorganismos o plantas. Usa enzimas purificadas para la ruptura de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas liberando de este modo cadenas cortas de aminoácidos y aminoácidos libres.

Fermentación microbiana. Durante la fermentación los microorganismos usados producen proteasas que digieren las proteínas obteniendo así péptidos y aminoácidos libres.

Cocción. La cocción produce un cambio conformacional en la estructura de las proteínas favoreciendo su biodisponibilidad para las proteasas que llevarán a cabo el proceso de digestión (Sayd T, Chambon C, Santé-Lhoutellier V.)

2.4 Bacterias ácido lácticas y su sistema proteolítico

Las bacterias del ácido láctico (LAB), incluidos los miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, se definen como bacterias Gram positivas, no esporuladoras, catalasa negativas y anaerobias facultativas con un metabolismo fermentativo (Axelsson 1998)

Las bacterias del ácido láctico (LAB) se han utilizado durante siglos como cultivos iniciadores o adyuvantes en las fermentaciones lácteas. La descomposición de las proteínas de la leche (proteólisis) por LAB desempeña un papel importante en la generación de péptidos y aminoácidos para el crecimiento bacteriano y en la formación de metabolitos que contribuyen a la formación del sabor de los productos fermentados (Liu, 2010).

Los componentes estructurales de los sistemas proteolíticos de las bacterias del ácido láctico se pueden dividir en tres grupos en función de su función: (i) proteinasas que descomponen las caseínas en péptidos, (ii) peptidasas que degradan los péptidos y (iii) sistemas de transporte que se desplazan los productos de degradación a través de la membrana citoplasmática (Kunji, 1996).

2.4.1 *Lactobacillus sp.*

Las bacterias del género *Lactobacillus sp.* son microorganismos pertenecientes a la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* (Tannock, 2004), se conocen alrededor de 97 especies diferentes, caracterizadas por habitar en el

intestino humano y de algunos animales y ser capaces de soportar condiciones drásticas por su paso a través del tracto gastrointestinal y colonizar el intestino humano. *Lactobacillus sp* produce ácido láctico como único producto de su fermentación (homofermentativo) y ácido láctico junto con otros ácidos como el acético (heterofermentativo) (Tannock, 2004)

3. Antecedentes

Segura-Campos M. R y col., 2012, reportaron la hidrólisis de fracciones ricas en proteína provenientes de harina de chíá, las enzimas utilizadas fueron alcalasa y flavourzyme. Obteniendo un IC50 para actividad inhibitoria de angiotensina convertidora-I de 8.86 μg proteína/ ml. Y para captación del radical ABTS una actividad equivalente de trolox (TEAC) de 7.31 mmol/L-mg proteína.

Orona-Tamayo, y col., 2015, hicieron el fraccionamiento de la harina de chíá de acuerdo a sus solubilidades por el método de Osborne y estas fracciones se hidrolizaron con pepsina proveniente de cerdo, tripsina y pancreatina. Obteniendo que las albúminas presentan la mayor actividad quelante de iones Fe con un IC50 de 1.4 ± 0.06 mg/ml; las albúminas y las globulinas presentaron la mayor actividad inhibitoria de angiotensina convertidora-I con IC50 de 377 y 339 μg /ml respectivamente; la actividad inhibitoria del radical ABTS mostro un IC50 de 89.3 y 91.9 μg /ml, esta actividad proviene de los péptidos obtenidos de las fracciones de albúminas y globulinas respectivamente. El mejor desempeño medido para la captación del radical DPPH se presentó con los péptidos provenientes de la fracción de las globulinas teniendo un IC50 de 74.7 μg /ml

Aguilar-Toalá J. E. y colaboradores. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. Encontraron en leche fermentada con *Lactobacillus Plantarum* péptidos con actividad antiinflamatoria, antihemolítica y antioxidante, siendo esta de 282.8–362.3 μmol of Trolox en la prueba ABTS.

4. Justificación

El creciente número de casos de enfermedades crónico degenerativas requiere la búsqueda de posibles tratamientos, siendo los péptidos bioactivos una alternativa viable. La semilla de chía es una fuente subutilizada de proteínas, lo cual la hace una posible fuente de este tipo de péptidos.

5. Hipótesis

La proteína de chía es fuente potencial de péptidos bioactivos al ser hidrolizada con *Lactobacillus sp.*

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Establecer los parámetros de la fermentación de concentrados de proteína de chía con *Lactobacillus*, para la obtención de fracciones con actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la enzima convertidora de Angiotensina-I.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para la obtención de concentrado de proteína de chía.
- Establecer las condiciones de fermentación de *Lactobacillus sp.* sobre proteína de chía.
- Cuantificar la actividad antioxidante *in vitro* de las muestras obtenidas por la hidrólisis con *Lactobacillus* a través de los métodos DPPH, ABTS.
- Medir la actividad inhibitoria de enzima convertidora de Angiotensina *in vitro*.

7. Metodología

7.1 Obtención de concentrado de proteína de chía

7.1.1 Desmucilaginado de la semilla

Se plantearon cuatro tratamientos los cuales se presentan en la tabla 1.

Para realizar estos tratamientos, se plantea usar 0.2 g de semilla.

Tabla 1. Tratamientos planteados para la extracción de mucílago de chía.

Tx	Hidratación 1:20	pH 8	80°C	Sonicación 3 ciclos de 3 min
1	X			
2	X	X		
3	X	X	X	
4	X	X	X	X

Una vez realizados los tratamientos la muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos.

7.1.2 Escalamiento de extracción de mucílago

El tratamiento con mejor desempeño fue el 4 por lo que se procedió a escalarlo para usarlo con 25 g de semilla usando 6,7,8,9 y 10 ciclos de sonicación.

Se realizó el escalamiento de la extracción de mucílago de la siguiente manera:

Se pesaron 25 g de semilla de chía y se hidrataron con 500 ml de agua destilada, es decir en una relación 1:20 como anteriormente se había manejado, durante 2 horas, posteriormente se llevó a pH 8 con la adición de NaOH y fue calentada durante 30 minutos. Después del tratamiento térmico se dejó enfriar a temperatura

ambiente hasta alcanzar los 37 °C, la muestra fue sonicada con 12 kHz en ciclos de 3 minutos con 1 de homogenización manual fuera del equipo.

Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos 10000 rpm, el sobrenadante se decantó y guardó en refrigeración, la pastilla fue puesta a secar a 50 ° C. Una vez seca el mucílago seco fue separado mecánicamente, y a las fracciones obtenidas se les midió la capacidad para retener agua (CRA) por triplicado.

7.1.3 Capacidad de retención de agua (CRA).

A las semillas una vez secas se les midió la capacidad de retener agua, esto se hizo agregándoles un exceso de agua destilada (10 ml), y dejando hidratar durante 24 horas, una vez finalizado este lapso las muestras fueron centrifugadas a 2000 RPM por 15 minutos. Posteriormente se pesó la pastilla y los resultados se expresaron en g de agua retenida/ g de semilla.

7.1.4 Desgrasado de la semilla

Una vez desmucilaginada la semilla de chía se procedió a desgrasar con hexano en relación 1:10 con hexano durante 12 horas a temperatura ambiente.

7.1.5 Determinación de contenido proteico

Para la semilla de chía y concentrado proteico de chía se usará el método Kjeldhal descrito por la AOAC.

Para las muestras líquidas que contienen proteína soluble se utilizó el método del Bradford.

7.1.6 Determinación de carbohidratos totales

En tubos limpios sumergidos en baño de agua-hielo se agregar 0,5 ml de muestra, 0,5 ml de fenol 5% p/v y 2,5 ml de SO_4H_2 se agitaron en forma enérgica. Se llevaron los tubos a baño María hirviendo durante 15 min, posteriormente fueron enfriados rápidamente en agua-hielo. Se leyó la absorbancia a 490 nm. La curva de calibración se hizo con dextrosa en concentraciones 0 a 50mg/ml.

7.1.7 Determinación de carbohidratos reductores

Se realizó por el método del ácido dinitrosalisílico (DNS) adaptado para microplaca por Alves y colaboradores (2017), el cual se basa en la capacidad de los azúcares reductores para reducir el DNS en medio básico, consiste en colocar por triplicado 25 μL en el pozo de la microplaca y hacerlo reaccionar con 25 μL de la solución de DNS al 1% en baño María con agua hirviendo durante 5 minutos para su posterior enfriado en hielo, una vez bajada la temperatura se agregan 330 μL de agua destilada y medida su absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro de placas, los datos obtenidos se interpolan en una curva patrón de dextrosa.

7.1.8 Determinación de grasas

La cuantificación de lípidos de las muestras se realizó con el método descrito por la AOAC, brevemente, se pesaron dos gramos de la muestra que se introdujeron en un cartucho de papel filtro cubriendo con algodón, este se colocó dentro del extractor Soxhlet al cual se le hizo pasar éter de manera constante durante seis horas, una vez transcurrido el tiempo se evaporó el éter dejando solo la materia grasa, y por peso se calculó el porcentaje de extracto etéreo con respecto de la muestra.

7.1.9 Determinación de cenizas

Se realizó por el método descrito por la AOAC que se basa en la destrucción de la materia orgánica por calcinación y su posterior determinación gravimétrica del

residuo. Consiste en calcinar 0.1 mg de la muestra hasta obtener cenizas blancas o grisáceas en una capsula de porcelana a peso constante.

7.2 Aislamiento de *Lactobacillus*

Para la obtención de la cepa a emplear, se aisló desde ProBiseis, un suplemento alimenticio que contiene *Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *rhamnosus*, *plantarum*, así como *bifidobacterium infantis* y *streptococcus thermophilus*, la metodología seguida fue la inoculación de un tubo que contenía 5 ml de caldo MRS con ProBiseis, dejando incubar 48 horas, una vez acondicionados los probióticos, se hizo aislamiento por agotamiento de asa en placa con agar MRS; esto se hizo hasta que se obtuvieron colonias completamente aisladas, posteriormente se seleccionaron 3 colonias que contaban con las características morfológicas propias de *Lactobacillus*, es decir pequeñas colonias redondas de color blanco y cremosas, y se sembraron en placa.

7.2.1 Conservación de las cepas.

La cepa con mejor capacidad proteolítica se sembró en caldo De Man Rogosa y Sharpe (MRS) incubándose a 37 °C/24 h en condiciones de anaerobiosis, el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm/10min/4°C, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en caldo MRS con 20 % de glicerol para su conservación a -80°C.

7.2.2 Determinación de actividad proteolítica de las cepas

Se usó el método de agar caseína reportado por Molin con modificaciones, brevemente, placas Petri con leche descremada al 5% y agar, se estriaron con las 3 cepas seleccionadas, dejando incubar durante 48 horas a 37° C.

7.2.3 Cuantificación de actividad proteolítica (Método de Kunitz)

Las cepas seleccionadas se incubaron en hasta llegar a 0.6 de absorbancia a 615 nm, para inocular tubos por triplicado que contenían caseína al 1% en buffer de fosfatos 100 mM, dejando incubar a 37° C durante una hora, posteriormente se agregó ácido tricloro acético 0.5 M incubando 20 minutos más para después centrifugar a 13000 rpm y separa el sobrenadante para cuantificar la proteína contenida por el método de Bradford.

7.2.4 Tinción de Gram

Se hizo un frotis sobre un portaobjetos que se fijó con calor, posteriormente se tiñó 1 min con Cristal Violeta, se lavó con agua destilada, después se le coloco solución de Yodo durante 1 minuto para después lavar con agua y decolorar con etanol acetona, se dejaron escurrir las muestras y se cubrieron con safranina, después de volvieron a enjuagar con agua. Las muestras se observaron a través del microscopio óptico.

7.3 Hidrólisis del concentrado de proteína de chía por *Lactobacillus sp.*

7.3.1 Formulación del medio

Por triplicado se inocularon 1×10^7 células de *Lactobacillus sp* en medio preparado de la siguiente manera para emular la composición proximal de la leche:

- 10.1 g de harina de chía desmucilaginada
- 100ml de agua destilada
- 7.34 g de dextrosa

Se monitoreó la fermentación durante 95 horas tomando muestra cada 12 horas aproximadamente.

7.3.2 Medición de actividad biológica

Para cuantificar la actividad biológica, las muestras obtenidas en la fermentación se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, y se tomó el sobrenadante.

7.3.2.1 Capacidad captadora del radical DPPH• (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo)

Se utilizó el método original de Brand-Williams y colaboradores (1995) modificado por Fukomoto y Mazza (2000) adaptado para su uso en microplaca. El método se basa en la disminución de absorbancia del radical libre DPPH, que cuando sufre la reducción por un antioxidante pasa de color púrpura a amarillo.

Se coloca la muestra a evaluar en la microplaca y se agreg el reactivo DPPH 50 µM usando como solvente metanol; se incuba durante 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se mide absorbancia en el espectrofotómetro UV de microplaca a una longitud de onda de 515 nm. El ensayo se realiza por triplicado para cada muestra.

La habilidad para donar electrones o átomos de hidrógeno de los péptidos sobre el DPPH es estimada con una curva de calibración que se obtiene graficando distintas concentraciones de trolox en función de la absorbancia del DPPH usando metanol como blanco; obteniendo de esta manera la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Se calculó el IC50 que es la concentración de péptidos necesaria para provocar una inhibición del 50% (IC50), con la Ecuación 1:

$$IC50 = 100 - \left[100 * \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \right) \right]$$

Ecuación 1. IC50 de las muestras

7.3.2.2 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

La técnica implica la producción directa del cromóforo ABTS a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta máxima de absorción a la longitud de onda de 734 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS⁺ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

Se pesó ABTS de Sigma Aldrich y de $K_2S_2O_8$ y se diluyen con agua destilada, dejando incubar durante 16 horas para generar el radical, esto se lleva a cabo en condiciones de obscuridad y a temperatura ambiente. Terminado el lapso necesario para obtener el radical se diluye este en etanol para así obtener una absorbancia de $0.7 \pm .03$ medida con una longitud de onda de 734 nm en el espectrofotómetro de placas.

El ensayo se realizó utilizando microplacas de 96 pozos colocando la muestra y la solución de ABTS, dejando reaccionar por 6 minutos, tomando la lectura al terminar el tiempo citado en el espectrofotómetro de placas a longitud de onda de 734 nm.

Se calcula el IC₅₀ con la Ecuación 1.

7.3.2.3 Quelación del ion Fe

La actividad quelante de iones ferrosos de los péptidos se midió según Durak, Baraniak, Jakubczyk, y ĄŹwieca (2013) modificado para su uso en microplaca. Se colocaron 150 μ l de la muestra en un pozo de la microplaca, se agregó $FeCl_2$ 0.25 mM y se dejó reaccionar por 10 minutos; transcurrido ese lapso se adicionó ferrozina con una concentración de 1 mM, se incubó durante 10 minutos más y enseguida se midió la absorbancia en el espectrofotómetro con longitud de onda 562nm. Las

absorbancias se interpolaron en una curva tipo de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se calculó el IC50 con la Ecuación 1.

7.3.2.4 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina

El efecto inhibidor de los péptidos de chía contra ECA, se evaluó de acuerdo con el método descrito por Luna-Suárez, y colaboradores, 2010).

Se añadió la muestra a buffer de boratos de sodio (que contiene NaCl y HHL(hipupuryl-histidyl-leucine)). Después se agregaron 0.001 U de ECA y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por la adición de HCl 1 M. El ácido hipúrico formado se extrajo con acetato de etilo que posteriormente se evapora a 80°C. El ácido hipúrico se resuspendió en agua destilada y se cuantificó a 228 nm en un espectrofotómetro. La actividad de cada muestra se ensayó por triplicado. El IC50 de la inhibición de la ECA fue calculado con la ecuación 1.

7.4 Ultrafiltración y evaluación del hidrolizado con mejores actividades biológicas

Las muestras en las cuáles presentaron mejores resultados se fraccionaron mediante ultrafiltración utilizando una membrana de 10 kDa y posteriormente una de 3kDa. A las fracciones se les determinó la actividad antioxidante y antihipertensiva

7.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida al 14%.

Se cargaron 10 µg de proteína proveniente de las muestras de la fermentación desnaturalizadas a 95° C durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó con corriente constante de 120 V hasta que la línea de corrida llego al extremo contrario del gel, se corrió en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell. Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie G250 durante 20 minutos en agitación para después ser decolorado en solución de agua/ácido acético/metanol.

7.5 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE

La técnica se llevó a cabo según lo descrito por Jyang et al. (2015) para la separación de polipéptidos de peso molecular 30-1 kDa en minigeles de poliacrilamida. El gel separador se preparó al 18% de acrilamida incluyendo 10% v/v de glicerol y 4.2 M de urea.

La electroforesis se llevó a cabo a 60 V hasta que la línea de corrida llego al gel separador, enseguida el voltaje fue aumentado a 120 v hasta terminar la electroforesis. Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie G250 durante 20 minutos en agitación para después ser decolorado en solución de agua/ácido acético/metanol

7.6 Electroforesis 2D

La electroforesis bidimensional de gel de poliacrilamida (2-D PAGE) es un método usado para la separación simultánea de miles de proteínas. Este método separa las proteínas individuales y las cadenas polipeptídicas de acuerdo con su punto isoeléctrico y su peso molecular.

La muestra se preparó usando el kit Ready Prep 2-D de Bio Rad, posteriormente el isoelectroenfoque se llevó a cabo en un gel con gradiente de pH de 3 a 7, la segunda dimensión se hizo con electroforesis de tricina-SDS PAGE.

7.6 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp.*

Las muestras obtenidas durante la fermentación se diluyeron en condiciones estériles a las concentraciones $1 \times 10^{(-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10)}$.

Se inoculaon 20 μ l por triplicado de cada dilución en cajas petri con medio de cultivo estéril agar (MRS), se incubarán por 48 horas a 37°C y al final de estas se hizo la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC).

7.7 Analisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando los programas SAS System (versión 9.0) y GraphPad Prism 7.

8. Resultados y discusión

8.1 Obtención de concentrado de proteína de chíá

8.1.1 Desmucilaginado de la semilla

Se midió la capacidad de retención de agua de las semillas como un método indirecto para conocer la eficacia de los tratamientos, esto se realizó debido a que la cantidad de agua retenida por las semillas está relacionada directamente con la cantidad de mucílago presente en la semilla. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1.

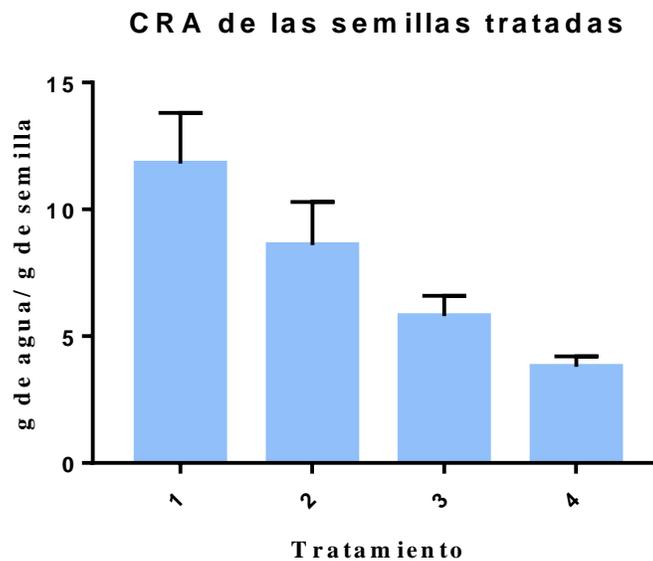


Figura 1. Capacidad de retención de agua de las semillas tratadas

La primera barra corresponde a la semilla solamente hidratada en relación 1:20, la segunda hidratación y pH ajustado a 8, la tercera además de las condiciones antes mencionadas incluye el calentamiento durante 30 minutos y la última barra corresponde al tratamiento con las condiciones previamente descritas y 3 ciclos de sonicación durante tres minutos. Como se puede observar el mejor desempeño para la eliminación de mucílago lo presenta el tratamiento 4 que muestra la disminución

de retención de agua en un 67.5% en comparación con el tratamiento 1 que es el blanco.

Las condiciones probadas fueron propuestas debido a que Muñoz *et al.* (2012) encontró que una temperatura de extracción de 80 ° C, pH 8,0 y relación de hidratación de 1:40 (semilla de chíá: 38 de agua) tenía un rendimiento de extracción de 5 a 7 g / 100 g. y se implementó la sonicación ya que es una tecnología emergente que se ha usado para la extracción de otros mucílagos como el de *Malvaviscus penduliflorus* y de *Hyptis suaveolens* como se dio a conocer en los trabajos realizados por Gallardo *et. al* 2013 y Jiménez *et. al et. al* 2015 respectivamente. Se hidrató la semilla en relación 1:20 durante 2 horas ya que Muñoz reporto que la semilla absorbe hasta 20 veces su peso en agua y a partir de las 2 horas permanece constante, el pH ayuda a la solubilización del mucílago al igual que la temperatura además de que esta ayuda a la desestabilización del mucílago, fenómeno que es complementado con la sonicación la cual produce cavitación que implica el estallamiento de microburbujas liberando una gran cantidad de energía.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de extracción se procedió a escalar el proceso para 20 g de semilla, como era de esperarse la cantidad de ciclos de sonicación aumenta con el tamaño del experimento por lo que se propusieron 6,7,8,9,10 ciclos de sonicación obteniéndose los resultados mostrados en la figura 2.

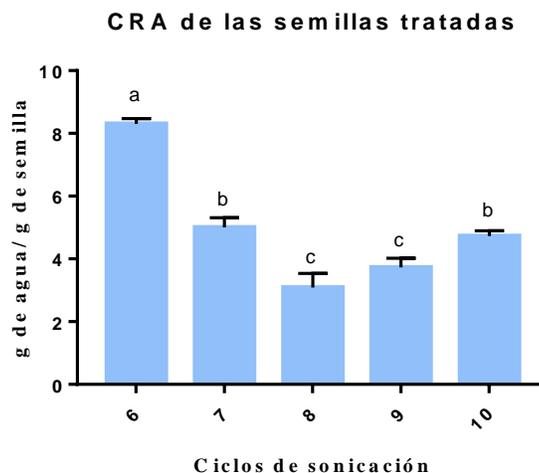


Figura 2. Capacidad de retención de agua en el escalamiento del proceso.

El mejor tratamiento de los propuestos fue con 9 sonicaciones alcanzándose un CRA de 3.7 el cual es cercano al encontrado por Morales (2017) el cual es de 2.25; sin embargo, el método usado por ella fue hidratar la semilla para su posterior secado y eliminación del mucílago por frotamiento. Si bien no se alcanza la total extracción de mucílago si se encuentra en un nivel razonable volviendo la semilla fácil de manejar en la extracción de proteína, además de que presenta una gran ventaja en cuanto al tiempo para la obtención de la semilla sin mucílago, la cual con este método es en 4 horas aproximadamente en comparación con el método de Morales el cual dura 4 días.

Se observa que en el tratamiento con 10 sonicaciones hay un aumento de la capacidad de retención de agua, esto puede deberse a la desestabilización del mucílago el cual pierde consistencia, provocando que se quede en la semilla después de la centrifugación, por lo que se infiere que hay un punto crítico en el cual la consistencia del mucílago es la ideal para ser retirado por decantación, si no se alcanza la semilla queda atrapada en el mucílago y si se sobrepasa el mucílago queda adherido a la semilla formando parte de la pastilla.

La desmucilagización de la semilla de chíá es importante ya que este interfiere en la extracción de proteína puesto que retiene a las proteínas en su matriz.

8.1.2 Desgrasado parcial de la semilla

Se obtuvo harina de semilla de chía desmucilaginada con un contenido de grasa del 4.4 ± 0.12 % determinado por el método Soxhlet.

8.1.3 Determinación de proteína de la semilla de chía

La determinación de proteína por micro Kjendahl indica que la semilla posee el 15.12%, la cual concuerda con lo reportado con diversos reportes que indican que el contenido de proteína varía de 14-23% como indica Ayerza en 2011.

Después del desmucilaginado y desgrasado de la semilla la cantidad presente de proteína fue de 37.51 ± 0.97 %, esto debido a la eliminación de carbohidratos durante el proceso de la extracción de mucilago y de lípidos durante el desgrasado.

8.1.4 Determinación de carbohidratos totales

La semilla desmucilaginada y desgrasada contiene 48.8 ± 1.4 % de carbohidratos.

8.1.5 Determinación de cenizas

La determinación de cenizas mostro que el contenido de estas en la semilla desmucilaginada y desgrasada es de 6.22 ± 0.08 %

8.2 Aislamiento de *Lactobacillus*

El microorganismo seleccionado para hidrolizar el concentrado proteico de semilla se chía es *Lactobacillus*, por lo que se procedió a su aislamiento, por medio de agotamiento de asa, y seleccionando 3 colonias con las características morfológicas propias de la cepa, se nombraron 1,2 y 3 y se muestran en la figura 3.



Figura 3. Colonias seleccionadas para pruebas de hidrolisis

8.2.1 Determinación de actividad proteolítica

A las colonias seleccionadas se les determino si poseían actividad proteolítica con el método de agar caseína, el cual consiste en hacer una estría en medio que contiene 5% de leche descremada y si hay decoloración del medio alrededor de la estría la cepa posee actividad proteolítica, la decoloración se presenta por la degradación de la caseína, proteína presente en la leche y que da color a la misma. Los resultados se presentan en la figura 4.

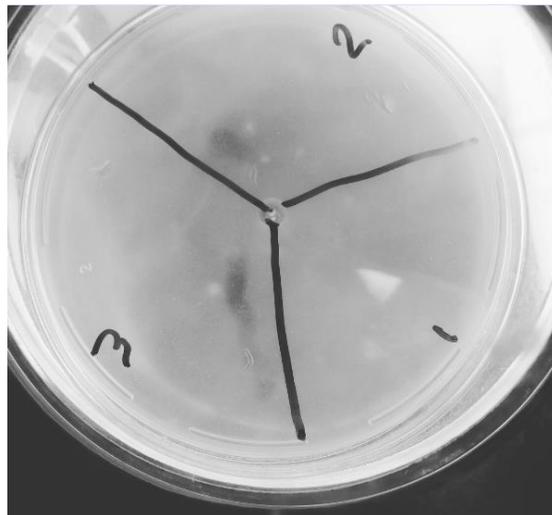


Figura 4. Prueba de agar-caseína practicada a las cepas 1,2 y 3

Como se observa en la figura 4 las tres cepas poseen actividad proteolítica, sin embargo, es mayor la decoloración producida por la cepa 3.

8.2.2 Cuantificación de actividad proteolítica (Método de Kunitz)

Para corroborar lo anterior se usó el método de Kunitz que consiste en hidrolizar caseína y la proteína no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético, dejando en el sobrenadante proteínas o péptidos de tamaño pequeño cuantificables por el método de Bradford, a continuación, en la tabla 2 se presentan los resultados de esta prueba.

Tabla 2. Actividad proteolítica de las cepas aisladas

Cepa	Proteína hidrolizada mg/ml
1	1.9±0.88
2	2±0.28
3	4.3±0.28

La cepa 3 mostró el mejor desempeño para el hidrolisis de proteína y por su morfología colonial, se sospecha que es *Lactobacillus casei* o *rhamnus*, estas cepas no son distinguibles morfológicamente ni por patrón fermentativo de la misma manera que no se distinguen de *paracasei*, para discernir que cepa se está empleando podría hacerse PCR de la región VI de la subunidad 16s del RNA ribosomal (Ward y Timmins., 1999)

8.2.3 Tinción de Gram

A la cepa 3 se le realizó tinción de Gram y se observó a través del microscopio con el lente 10X, la figura 5 fue la obtenida, se aprecian células Gram positivas y con la morfología de bacilo, que es lo esperado de una célula de *Lactobacillus*.

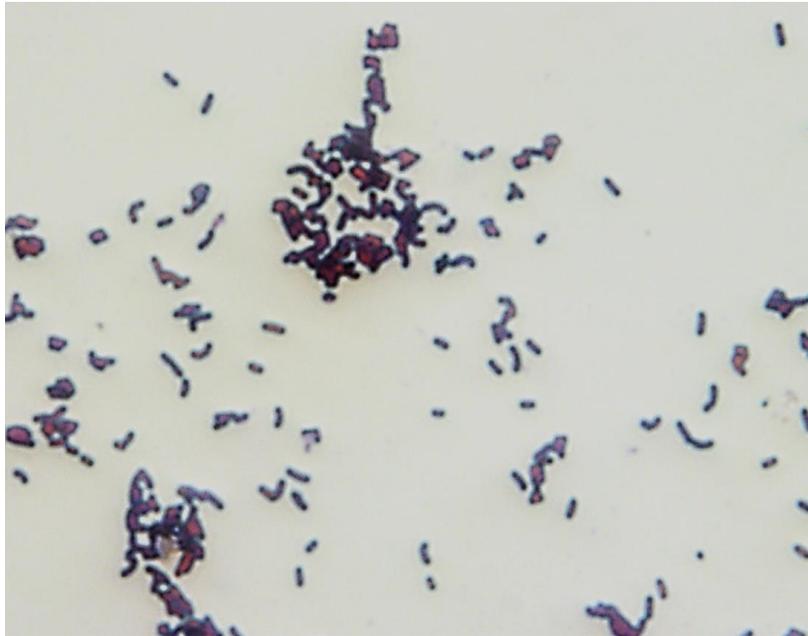


Figura 5. Observación bajo el microscopio de la Ceba 3 bajo el objetivo 10x.

8.3 Fermentación de proteína de chía por *Lactobacillus sp.*

8.7 Cinética de crecimiento bacteriano

La figura 11 representa al logaritmo natural del conteo en placa de *Lactobacillus*, la fase logarítmica se presenta dentro de las primeras 44 horas, dentro de este periodo se presentan las mejores actividades antioxidantes que se provocan por la hidrólisis de proteína del medio. También se observa que no hay periodo de adaptación por parte del microorganismo lo que indica que el medio a base de harina desmucilaginada y desgrasada de chía cuenta con los requerimientos necesarios para el crecimiento de nuestra bacteria.

Cinética de crecimiento bacteriano

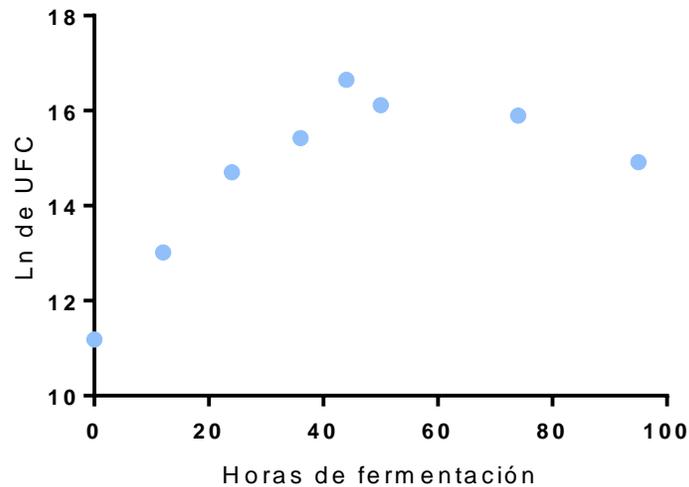


Figura 6. Cinética de crecimiento bacteriano

8.3.1 Cuantificación de proteína

Se cuantificó por el método de Bradford la proteína soluble contenida en las muestras, los resultados se presentan en la figura 6 donde se muestra un descenso en el contenido de proteína, esto producto de la utilización de esta por parte de *lactobacillus* para su metabolismo, este descenso se mantiene hasta las 18 horas de fermentación y a partir de este momento se mantiene constante y sin diferencia significativa.

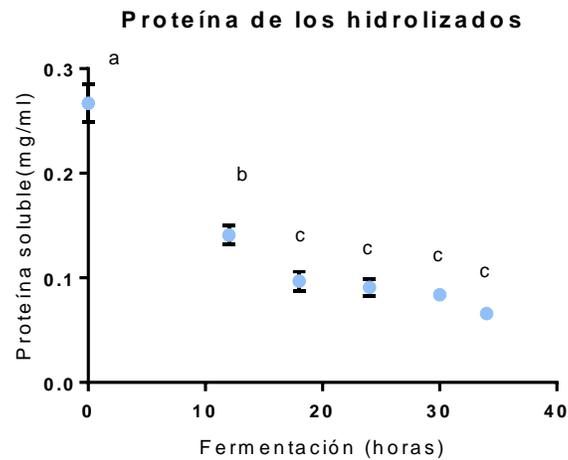


Figura 7. Proteína soluble de las muestras

8.3.2 Cuantificación de carbohidratos

Se determinó la cantidad de azúcares reductores por medio del método de DNS, obteniendo los siguientes resultados donde se observa que al igual que con el contenido de proteína se observa una disminución marcada para a partir de las 18 horas mantenerse constante, de igual manera a lo ocurrido con el contenido de proteína soluble, esto debido al consumo de nutrientes por parte de *Lactobacillus* inoculados en el medio.

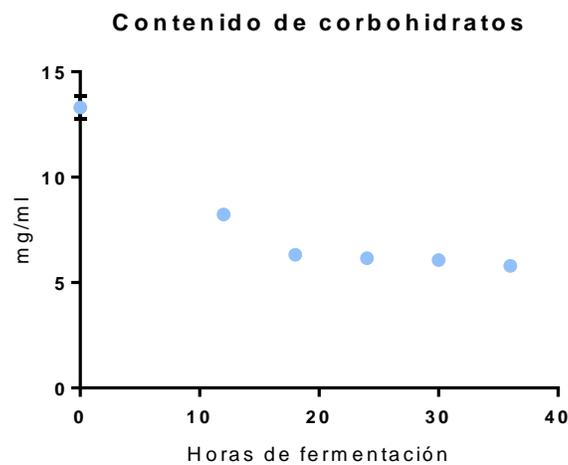


Figura 8. Carbohidratos contenidos en los hidrolizados

8.3.2 Determinación de actividad antioxidante

8.3.2.1 DPPH

Los resultados de la prueba de inhibición del radical DPPH se muestran en la figura 8 donde se grafica el IC50 que es la cantidad necesaria de una sustancia para llevar a la mitad una reacción, es decir mientras menor sea el IC50 la efectividad del antioxidante es mayor, el ic50 menor obtenido fue de $108 \pm 0.001 \mu\text{g/ml}$ de proteína, esto a las 34 horas sin embargo el análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa con las muestras obtenidas desde las 24 horas. El ic50 conseguido a las 34 horas de fermentación es menor al reportado por Orona y colaboradores quienes hidrolizaron harina de chía por medio de una digestión *in vitro* donde encontraron un ic50 de $133.5 \mu\text{g/ml}$, de igual manera el ic50 del hidrolizado de proteína de chía es superior al encontrado por Sarina en el 2017 quien hidrolizo con alcalasa glutelinas provenientes de la avena que fue de 1.28 mg/ml . Esta diferencia de efectividad entre los hidrolizados comparados podría deberse a el uso limitado de enzimas, las cuales no podrían estar hidrolizando de manera extensiva la proteína para poder así liberar péptidos con actividad antioxidante.

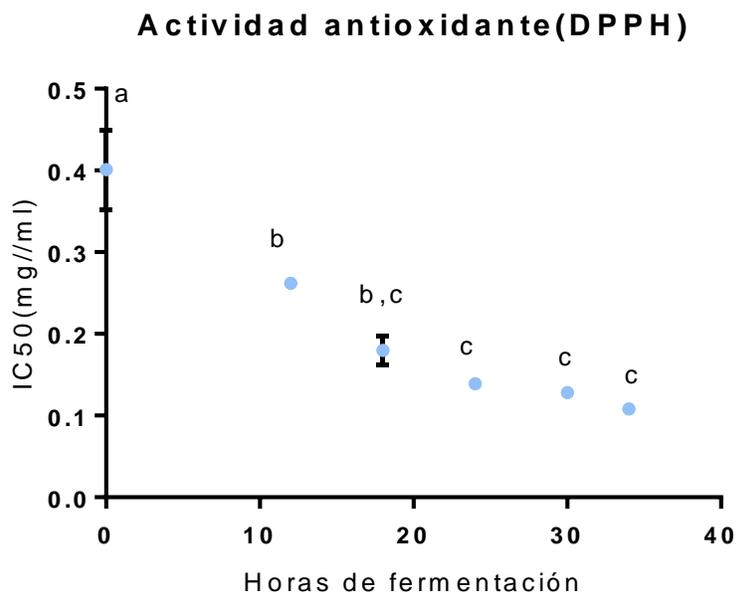


Figura 9. IC50 en la prueba DPPH de los hidrolizados

8.3.2.2 ABTS

Se determinó la actividad antioxidante por el método ABTS, los resultados se encuentran graficados en la figura 9, donde se observa un aumento de la actividad antioxidante conforme avanza el tiempo de hidrolisis por *Lactobacillus*, hasta las 18 horas que no hay diferencia significativa entre los IC₅₀ siguientes, siendo el más bajo 31 µg/ml a las 18 horas. Segura y colaboradores en el 2012 hidrolizaron proteína de chía con alcalasa y flavourzyme siendo su mejor resultado en esta prueba 7.31 mmol/L de trolox por mg de proteína, el equivalente en trolox del hidrolizado por *Lactobacillus* 15.03, prácticamente el doble del valor reportado por el autor mencionado; Li en el 2017 identificó el péptido GARGPQ a partir de cartílago de tiburón hidrolizado con tripsina, esta secuencia aminoacídica presenta un IC₅₀ de 0.18 mg/ml que es mucho mayor al presentado en este trabajo. De igual manera que en la prueba de DPPH podría explicarse por la gran cantidad de proteínas secretada por *Lactobacillus* para poder aprovechar la proteína presente en el medio.

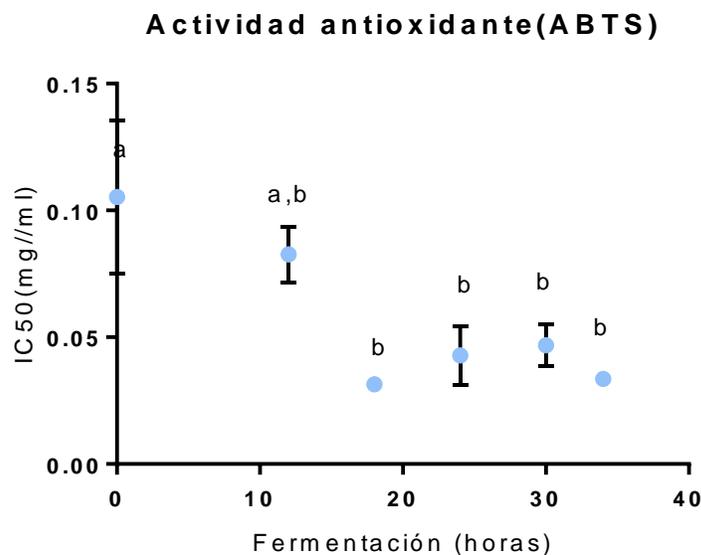


Figura 10. IC₅₀ en la prueba ABTS de los hidrolizados

8.3.2.4 Quelación del ión Fe

En prueba de estabilización de iones Fe se obtuvieron los resultados presentes en la tabla siguiente donde el mejor IC50 es el obtenido a las 34 horas, pero desde las 12 horas no se observa diferencia significativa. El IC50 es de $13.1 \mu\text{g} \pm 0.001$ y el presentado por Donomacar en 2015 para la harina de chía digerida *in vitro* fue de 1.6 mg/ml, un valor muy elevado en comparación con el conseguido en este trabajo a pesar de que ambos trabajos fueron realizados con la misma semilla, siendo mucho mejor el conseguido con la fermentación microbiana. La buena actividad para quelar metales de los hidrolizados podría usarse para el uso en alimentos, ejemplo de ello es la mayonesa que emplea EDTA para prevenir la rancidez, además no solo podría servir para la conservación de las propiedades organolépticas sino también podría mejorarse las propiedades funcionales del alimento, en este caso la emulsión. Los iones de Fe pueden catalizar la formación de radicales que desencadenen reacciones en la cadena de oxidación, lo que resulta en la peroxidación de lípidos y en el daño al ADN en los sistemas biológicos y alimentarios, por lo que la quelación del ion metálico puede retardar la reacción en cadena de la peroxidación (Zhou, et al, 2012).

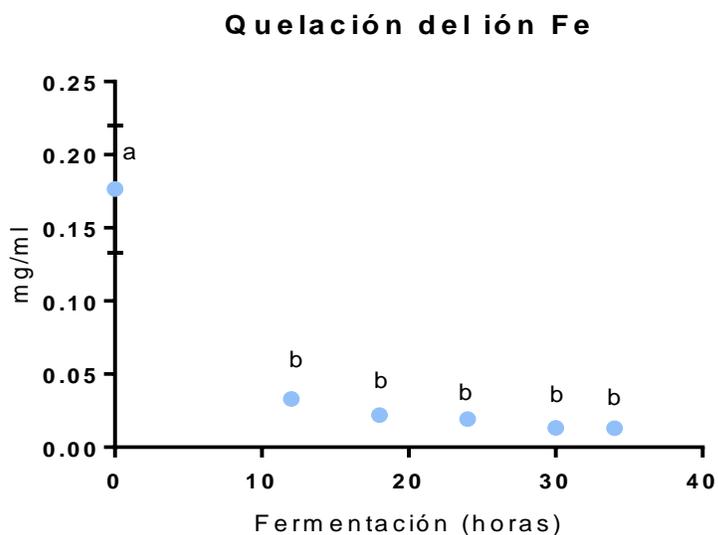


Figura 11. IC50 en la prueba de Quelación de ion Fe de los hidrolizados

7.3.2.4 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina

Las muestras obtenidas fueron llevadas a la concentración de 0.3 µg/ml para evaluar su capacidad para inhibir a la ECA, la harina desmucilaginada y desgrasada presenta una actividad de 28.57±8.4, esta actividad se ve aumentada por la hidrólisis de la proteína, llegando a ser del 100% a las 24 horas de fermentación teniendo un descenso de la actividad después de este tiempo, esto podría deberse a la continua hidrólisis de la proteína o al consumo de los péptidos responsables de la actividad por parte de las bacterias.

Orona y colaboradores también trabajaron con péptidos liberados por digestión *in vitro*, obteniendo IC₅₀ de 377 y 339 µg/ml para las fracciones de albumina y globulina respectivamente, estos valores distan mucho de los obtenidos con la hidrólisis por *Lactobacillus*. Kamath en 2007 obtuvo péptidos de la α-kafirina, proteína de reserva del sorgo, consiguiendo IC₅₀ de 1.3 to 24.3 µg/ml que son valores ya menores y relativamente cercanos a los obtenidos en este trabajo, el autor relaciona la alta actividad debido a la presencia en gran cantidad de prolina en la proteína, este es un aminoácido que se ha relacionado con la actividad antihipertensiva de los péptidos; esto puede relacionarse con los resultados de este trabajo ya que *Lactobacillus* en su maquinaria proteolítica posee prolin peptidasas que podrían estar liberando péptidos que en su extremo contengan este aminoácido.

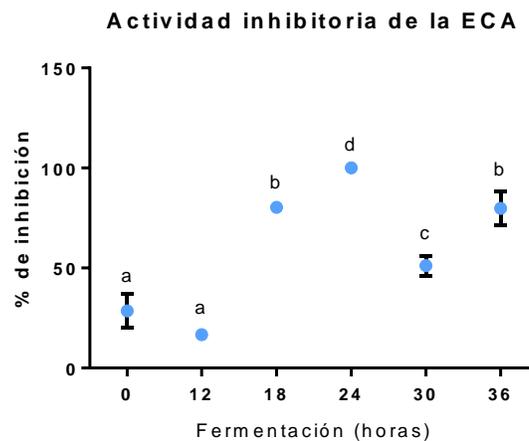


Figura 12. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina

8.3.3 Ultrafiltración y evaluación del hidrolizado con mejores actividades biológicas

En general los hidrolizados presentaron buenas actividades antioxidantes y antihipertensivas, siendo que las actividades antioxidantes se mantienen constantes a través del tiempo por lo que el parámetro para la selección del tiempo de fermentación para ultrafiltrar fue la actividad inhibidora de la ECA, es decir se tomó la muestra obtenida a las 24 horas que tuvo el mejor desempeño en esta prueba. El hidrolizado se ultrafiltró con membranas de 10 y 3 kDa y a las fracciones se les determinaron las actividades antioxidantes y antihipertensivas. Los IC50 para la actividad antioxidante se muestran en la tabla 3 en $\mu\text{g/ml}$.

Muestra	DPPH	ABTS	Quelación de Fe
>10 kDa	65.41 \pm 1.14	413.23 \pm 2.4	26 \pm 0.0006
Entre 10 y 3 kDa	14.68 \pm 1.21	68.41 \pm 3.22	7 \pm .0013
< 3 kDa	14.7 \pm .52	34.23 \pm 2.19	3 \pm 0.002

Tabla 3. IC50 para la actividad antioxidante de los ultrafiltrados

La fracción arriba de 10 kDa presenta pérdida de actividad antioxidante, en concordancia con el aumento de la actividad de las fracciones de tamaño inferior.

La fracción con mejor actividad es la menor a 3 kDa lo que concuerda con la literatura que indica que los péptidos antioxidantes tienen un tamaño entre 10 kDa y 0.5 (Saito y col., 2013.)

La actividad antihipertensiva en la fracción entre 3 y 10 kDa fue de 70.83 \pm 5.8% de inhibición y la fracción menor a 3 kDa siguió inhibiendo al 100% la ECA.

8.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

El gel obtenido de la electroforesis se presenta en la figura 12, donde se observa en el carril 2 la presencia de distintas proteínas, siendo las bandas más notorias la mayor a 250, 65, 33 y la de 11 kDa, después de 18 horas de fermentación la banda mayor a 250 y la de 33 son degradadas totalmente como se puede ver en el carril 3, conforme la fermentación sigue avanzando la banda de 65 kDa pierde intensidad y la de 11 se degrada a las 18 horas; en el carril 4 se observan péptidos menores a 15 kDa. El marcador empleado fue Page Ruler Unstained de Thermo Fisher cargado en el carril 1.

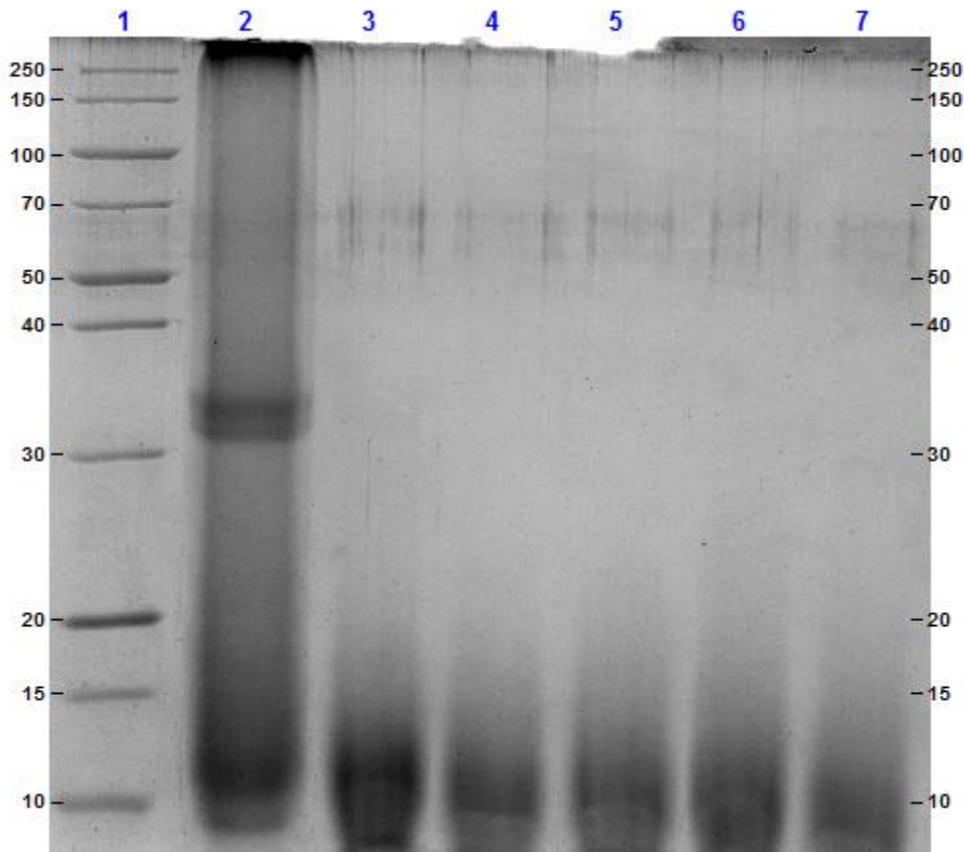


Figura 13. SDS-PAGE en condiciones reductoras, carril 1 marcador Page Ruler, carril 2 proteínas sin hidrolizar, carril 3 12 horas de fermentación, carril 4 18 horas de fermentación, carril 5 24 horas de fermentación, carril 6 30 horas de fermentación, carril 7 34

8.5 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE

La figura 13 muestra el patrón electroforético de los hidrolizados corridos en un gel de Tricina-SDS-PAGE, el cual es usado por su mejor resolución para proteínas o péptidos con peso molecular menor a 30 kDa en comparación con el gel SDS-PAGE, se observa que las proteínas de mayor tamaño quedan retenidas en el gel espaciador que es la zina que se ve de manera más oscura en la parte superior, las bandas de 65 kDa vistas en la figura 12 quedan en la frontera entre el gel espaciador y el separador. De igual manera a lo descrito anteriormente los péptidos de interés tienen un tamaño menor a 14 kDa. El marcador fue construido con proteínas de las cuales se tenía conocimiento de su peso molecular y corroborado con el marcador Page Ruler Unstained de Thermo Fisher en un gel SDS-Page.

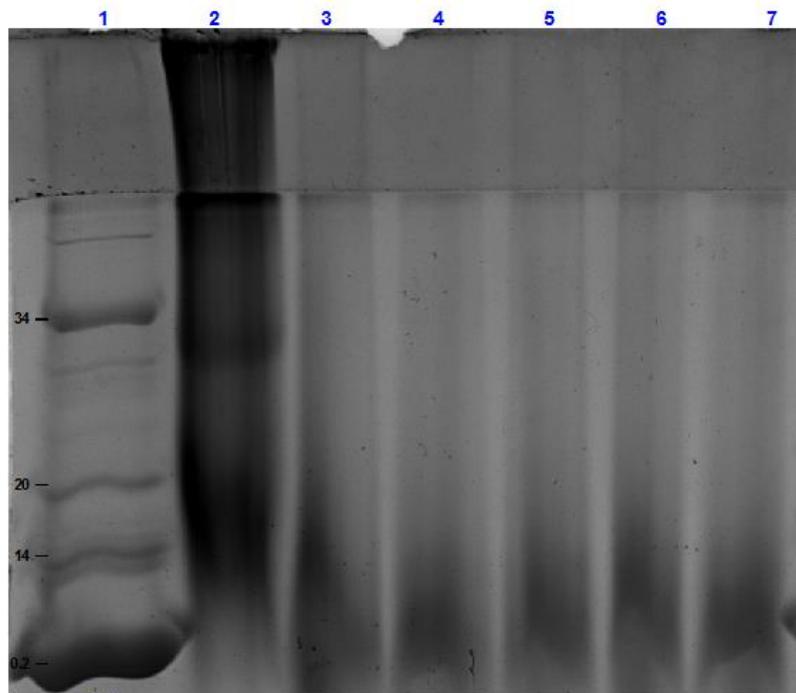


Figura 14. Tricine-SDS-PAGE, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 proteínas sin hidrolizar, carril 3 12 horas de fermentación, carril 4 18 horas de fermentación, carril 5 24 horas de fermentación, carril 6 30 horas de fermentación, carril 7 34 horas de fermentación.

8.6 Electroforesis 2D

La figura 14 es el patrón electroforético del hidrolizado obtenido a las 24 horas de fermentación. En la región de pH de 3 a 5 se encuentran proteínas de 3.1 kDa y en la región de 4.5 a 6 se encuentran péptidos de menor tamaño a 0.2 kDa, la zona de pH de 8 a 10 es rica en péptidos la mayoría de menor tamaño a 0.2 kDa y con punto isoeléctrico de 9.3 y un peso de 2.2 kDa. El marcador empleado fue el empleado para la electroforesis en Tricine-SDS PAGE y fue cargado del lado izquierdo. Los pesos moleculares fueron calculados con el software Image Lab de Bio Rad.

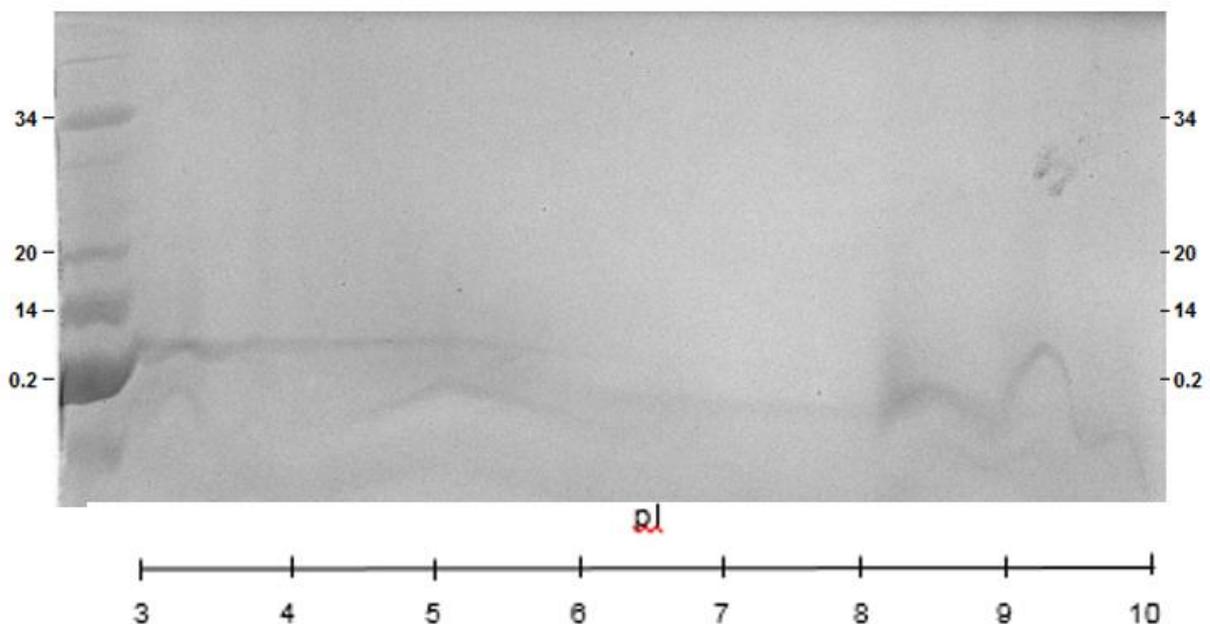


Figura 15. Gel de acrilamida de 2 dimensiones (2D-PAGE) de péptidos obtenidos a las 24 horas de fermentación.

El patrón electroforético del hidrolizado de 24 horas ultra filtrado con membrana de 3 kDa se muestra en la figura 15, es la fracción más rica en péptidos antihipertensivos y antioxidantes. Los péptidos mayores a 3 kDa observadas en la figura 14 ya no están presentes en este gel debido a la ultrafiltración. Los péptidos responsables de las actividades biológicas se encuentran por debajo de los 3 kDa

y con puntos isoeléctricos variables, pero con mayor presencia en la zona de pH de 8 a 10.

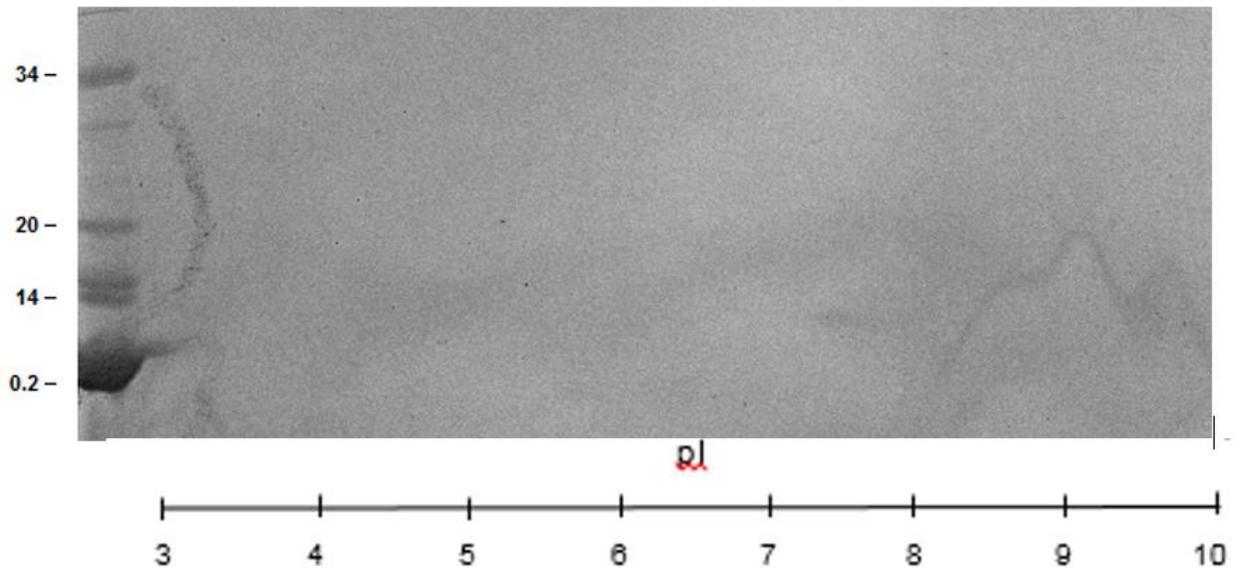


Figura 16. Gel de acrilamida de 2 dimensiones (2D-PAGE) de los péptidos obtenidos con 24 horas de fermentación menores a 3 kDa.

9. Conclusiones

El tratamiento de sonicación aunado a condiciones alcalinas y el aumento de temperatura son eficaces para la extracción de mucilago, que complementado con la extracción de lípidos producen un concentrado de proteína a partir de la semilla de chía.

Las proteínas de la semilla, son hidrolizadas extensivamente por medio de las proteasas de *Lactobacillus* que se ve corroborada en los geles de poliacrilamida.

Los hidrolizados obtenidos presentan buenas actividades antioxidantes y antihipertensivas, siendo necesarias 24 horas para obtener péptidos que a una concentración de 0.3 μg inhiben el 100% de la ECA.

Esto representa una posible alternativa para el tratamiento de la hipertensión y la prevención de enfermedades provocadas por el estrés oxidativo, además estos péptidos podrían ser empleados como antioxidantes en la industria.

10. Bibliografía

- Abbenante, G., Fairle, D.P. (2005). Protease inhibitors in the clinic. *Journal of medicinal Chemistry*, 1, 71-104.
- Argos, P., Narayana, S.V.L. y Nielsen, N.C. 1985. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *Plant Molecular Biology*. 5:165-173.
- Aufrère, J.L., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emile, J.L., Giovanni, R. y Maupetit, P. 1992. Estimation of organic matter digestibility of whole maize plant by laboratory method. *Animal Feed Science and Technology* 36:187- 204.
- Axelsson L (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A (eds) *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, New York, pp 1–72
- Ayerza, R.; Coates, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica L.*). *Ind. Crops Prod.* 2011
- Ayerza, R. (2009). The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica L.*) as affected by environmental factors. *Journal of Oleo Science*, 58, 347354.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44, 131135.
- Ayerza, R., Wayne Coates. 2006. Chía, redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas (1 ed.). Buenos Aires.
- Badui, S. 1996. Química de los alimentos 119-121.
- Cahill, J.P. 2004. Genetic diversity among varieties of chia (*Salvia hispanica L.*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:773-781.

- Casey, R. y Domoney, C. 1984. The genetics of legume storage proteins. *Philosophical Transaction of the Royal Society London B* 304:349-358.
- Castro C., Luna S., Paredes O., 2012, Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression, *Journal of Biotechnology*, Volume 158, Issues 1–2, Pages 59-67
- Chirino, Y.I., Orozco-Ibarra, M., Pedraza Chaverry J.(2006). Evidencias de la participación de peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de investigación clínica*, 58(4), 350-358.
- Domínguez-Vázquez, G., Berlin, B., Ramírez-Castro, A. y Estrada-Lugo, E. 2002. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas. *Anales del Instituto de Biología Vol.73*
- Hernández, L. 1994. La flora endémica de la Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima. *Observaciones Preliminares*.
- Iwaniak, A; & Minkiewics, P. 2007. Proteins as the source of physiologically and funcionally activy peptides. *Acta Scientiarium. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 5-15.
- Korhonen H, Pihlanto A, (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 47, 2003, Pages 175–276
- Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN: The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996, 70:187-221.
- López-Correa, S.M; & Carranza-Madriral, J. 2011. Hipertensión metabólica: una realidad en México. *Medicina Interna de México*, 27(4), 378-384.
- Li, X. R., Chi, C. F., Li, L., & Wang, B. (2017). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Protein Hydrolysate of Scalloped Hammerhead (*Sphyrna lewini*) Cartilage. *Marine drugs*, 15(3), 61.
doi:10.3390/md15030061

- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, 11, 36. doi:10.1186/1471-2164-11-36
- Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:363---73.
- Michael C. Latham(2002), NUTRICIÓN HUMANA EN EL MUNDO EN DESARROLLO, DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, Roma, 2002
- Miranda, C.S. 1978. Evolución de cultivares nativos de México. *Ciencia y Desarrollo* 3:130-131.
- Olivos-Lugo, B., Valdivia-Lo ´pez, M., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica L.*). *Food Science and Technology International*, 1, 18.
- Orona D., Valverde M., Nieto B y Paredes O,. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica L.*) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 64. 10.1016/j.lwt.2015.05.033.
- Saito, K., Hao, J.D., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry. *J. Agric. Food Chem.*, 51(12), 3668-3674. <http://dx.doi.org/10.1021/jf021191n>
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 193201.
- Sarina Ma, Meili Zhang, Trust Beta, Tungalag Dong, Xiaolan Bao & Ziqin Li (2017) Purification and structural identifiurcation of glutelin peptides derived from oats, *CyTA - Journal of Food*, 15:4, 508-515, DOI: 10.1080/19476337.2017.13_01555

- Sayd T, Chambon C., Santé-Lhoutellier V. (2016). Quantification of peptides released during *in vitro* digestion of cooked meat. Food Chemistry 197 1311–1323
- Segura Campos, M; Chel Guerrero, L & Betencour Ancona, D. 2013. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: Omnia Sciencie.12-22.
- Segura R., Salazar M., Chel A., Betancur L.,(2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica L.*) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. LWT - Food Science and Technology. 50. 723-731. 10.1016/j.lwt.2012.07.017.
- Shewry, P.R y Halford, N.G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. Journal of Experimental Botany 53(370):947-958.
- Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, T. Nakamura (1992) Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion J. Agr. Food Chem., 40, 945-948.
- Skow D., Smith E., Shaughnessy P.(2003.) Combination therapy ACE inhibitors and angiotensin- receptor blockers and hearth failure. American Family Physician, 68(9), 1795-1798
- Tannock Gerald W. (2004), A Special Fondness for *Lactobacilli*, Journal American Society Microbiology, 70(6), 3189–3194.
- Teijón-Rivera J. M., Blanco-Gaitán D., Agrasal-Aragón C., Olmo-López R.(2001) Bioquímica Estructural: Conceptos y test. Editorial Tebar. Madrid, España.
- Vasudeva Kamath, Sajeeda Niketh, Arun Chandrashekar, P.S. Rajini, Chymotryptic hydrolysates of α -kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity, Food Chemistry, Volume 100, Issue 1, 2007, Pages 306-311.

- Vermeirissen, Van Camp, Verstraete. 2004. Bioavailability of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of nutrition*, 92, 357-366.
- Vertuani S., Angusti A y Manfredini S., “The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview”, *Current Pharmaceutical Design* (2004) 10: 1677. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>
- Ward, L. J. and Timmins, M. J. (1999), Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90-92.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. (2009). *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: 952-958.
- Withney E., Rolfes S.R., (2008). *Understating nutrition*, 11th edn. Thomas Wadsworth, Belmont.
- Zhou, H.; Chen, X.; Wang, C.; Ye, J.; Chen, H. Purification and Characterization of a Novel ~18 kDa Antioxidant Protein from Ginkgo biloba Seeds. *Molecules* 2012, 17, 14778-14794.