



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIHIPERTENSIVA DE EXTRACTOS DE GUSANO DE LA  
HARINA (*Tenebrio molitor*) Y CHAPULÍN (*Sphenarium  
purpurascens*) FERMENTADOS CON CEPAS ESPECÍFICAS DE  
*Lactococcus lactis***

---

Por:

**Adilene Mendoza Salazar**

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Adilene Mendoza Salazar, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Aarón F. González Cordova  
Director



---

Dra. Belinda Vallego Galland  
Integrante del comité de la tesis



---

Dr. Adrián Hernández Mendoza  
Integrante del comité de la tesis



---

Dra. Andrea M. Liceaga  
Integrante del comité de la tesis

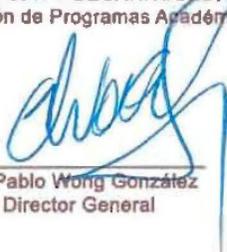
## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Potencial Actividad Antioxidante y Antihipertensiva de Extractos de Gusano de la Harina (*Tenebrio molitor*) y Chapulín (*Sphenarium purpurascens*) Fermentados con Cepas Específicas de *Lactococcus lactis*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Adilene Mendoza Salazar, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por darme la oportunidad de realizar mis estudios en el Programa de Maestría en Ciencia y poder crecer profesionalmente.

A Dios, por permitirme vivir este momento en mi vida profesional, porque sabemos que Dios dispone todas las cosas para el bien de quienes lo aman (Ro 8,28).

A mi director de tesis, Dr. Aarón F. González Córdova, le agradezco el haberme recibido como su estudiante y por brindarme su apoyo y asesoría durante mi etapa de formación de maestra en ciencias. Sobre todo, le agradezco el haberme permitido trabajar con el tema de insectos comestibles, pues es un tema de gran interés para mí.

A mis asesores, Dr. Belinda Vallejo Galland, Dra. Andrea M. Liceaga y Dr. Adrián Hernández Mendoza, por su valiosa asesoría académica a lo largo de mi trabajo de tesis.

Al personal docente del programa de maestría en ciencias, sobre todo a la Dra. Teresa Gollas Galván, Dr. Martín Valenzuela Meléndrez y Dr. Alfonso García Galaz, sin lugar a dudas me llevo gran conocimiento de ustedes, son excelentes profesores, pero sobre todo agradezco su calidez humana, son excelentes personas.

A Todo el personal del CIAD, Coordinación de Programa Académicos, Biblioteca, Unidad de Transferencia e Innovación que me brindó su amable apoyo. Laura García, Gerardo Reyna, Luis Conde, Marovi Cortés y Denia Huez.

A M.C. Carmen Estrada Montoya por su apoyo técnico durante mi estancia en CIAD.

A M.C Ricardo Reyes Díaz, por su apoyo técnico durante mi estancia en CIAD, pero sobre todo agradezco tu amistad y tu paciencia.

Al Dr. Miguel A. Mazorra Manzano, por su tiempo brindado para ayudarme con mis dudas. así mismo agradezco la buena convivencia.

A la Dra. Lourdes Santiago López, por su apoyo técnico durante el desarrollo de mi tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, Carmen, Adelmo, Daniel, Miriam, Olimpia, Luis, Eduardo, pero sobre todo a Rodrigo Sigala, José Teutle, Angélica Martínez, Miguel A. Rendón, porque los considero mis amigos, gracias por todos los buenos momentos que compartimos juntos,

su compañía hizo más grata mi estancia en CIAD. También quiero agradecer a aquellos que estuvieron antes, Ana M. Méndez, Verónica Cruz, Ildefonso Encinas, Maleja Ospina, Rocío Hernández, Francisco Ruiseco, Hibraín Ramirez (Many manito), Lady Valera, Nicolás González y Aline Reyes, porque compartí buenos momentos con ustedes, y finalmente a aquellos que conocí por CIAD, Leonardo Fox y Stephanie Navarro, gracias a todos por su amistad.

Al Dr. Eleazar Aguilar Toalá (Ele sensei), gracias por tu tiempo y tu apoyo técnico aun sin estar en CIAD, pues siempre has tomado un poco de tu tiempo para poder ayudarme con mis dudas.

Al M.C Paúl F. González Cuevas, agradezco que aún sin estar en CIAD siempre tienes tiempo para ayudarme a resolver mis dudas, pero, sobre todo, gracias por el tiempo para escucharme y aconsejarme.

A todas las personas que me han acompañado durante toda mi formación profesional, a todos mis maestros, porque ustedes fueron quienes sembraron en mí los cimientos de mi formación académica. Los recuerdo con gran cariño y respeto. Muchas gracias.

A toda mi familia, porque siempre he contado con su apoyo y a mis amigas Evelyn Hernández, Daniela Olguín y Estefanía López, gracias por siempre escuchar mis crisis durante la maestría, gracias por sus ánimos y su amistad, las quiero.

A mi madre y mi padre, María Reyna Salazar Andrade y Zenén Mendoza Cid, por su amor y su apoyo incondicional, y a mi hermano Fernando Mendoza Salazar, eres mi más grande motivación. Este logro es por y para ustedes, Los amo.

Finalmente quiero agradecer a Elías Silva Búrquez, haberte conocido ha sido y será, siempre lo mejor que me pasado, gracias por tu amor, tu apoyo incondicional y tiempo compartido, gracias por todos los momentos que pasamos juntos, que, sin lugar a dudas serán los mejores recuerdos de Hermosillo. Te quiero hoy y siempre.

## DEDICATORIA

**A mis padres y hermano:**

Porque son mi motivo día a día.

Me han enseñado que antes de ser una persona exitosa,  
debo ser una buena persona.

Soy lo que soy gracias a ustedes.

Los amo.

*“Un gramo de bondad vale más que una tonelada de intelecto” -Alejandro Jorodowsky*

*“Depende de ti lo lejos que llegarás, si nunca lo intentas jamás lo sabrás”.*

– Merlín (La espada en la piedra, 1963)

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. Insectos: Características Generales y Distribución Geográfica.....	16
2.2. Impacto Ambiental del Cultivo de Insectos.....	19
2.3. Insectos Comestibles y su Valor Nutricional.....	21
2.4. Legislación.....	23
2.5. Aspectos de Seguridad en el Consumo de Insectos.....	24
2.6. Incorporación de los Insectos en la Industria de Alimentos.....	27
2.7. Insectos como Fuente de Péptidos Bioactivos.....	29
2.7.1. Péptidos Bioactivos.....	29
2.7.1.1. Métodos de obtención de péptidos bioactivos.....	31
2.7.2. Péptidos Bioactivos de Hidrolizados de Proteínas de Insectos.....	33
2.7.3. Fermentación de Insectos.....	35
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Específicos.....	38
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
5.1. Medios de Cultivo y Reactivos.....	39
5.2. Cultivos Bacterianos de Trabajo.....	39
5.3. Preparación de las Muestras de Harina de Gusano de la Harina y Chapulín.....	40
5.4. Preparación de las Muestras a Inocular.....	40
5.5. Caracterización Fisicoquímica.....	40
5.5.1. Humedad.....	41
5.5.2. Grasa.....	41
5.5.3. Fibra Cruda.....	42
5.5.4. Cenizas.....	43
5.5.5. Proteínas.....	44

## CONTENIDO (Continuación)

5.6. Propagación, Selección de Condiciones para la Pre-adaptación de las Cepas a la Proteína de Gusano de la Harina y Chapulín.....	45
5.7. Condiciones de Fermentación.....	47
5.8. Cuantificación de Proteína.....	47
5.9. Determinación del Grado de Hidrólisis Mediante el Método de Ortoftaldialdehído.....	48
5.10. Actividad Antioxidante.....	48
5.10.1. Determinación de la Actividad antioxidante por el Método TEAC.....	49
5.10.2. Determinación de la Actividad antioxidante por el Método ORAC.....	49
5.10.3. Determinación de la Actividad antioxidante por el Método DPPH.....	50
5.10.4. Determinación de la Actividad antioxidante por el Método FRAP.....	50
5.10.5. Contenido de Polifenoles Totales.....	51
5.11. Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina.....	51
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
7.1. Caracterización de las Muestras Gusano de la Harina y Chapulín.....	54
7.2. Propagación y Pre-adaptación de Lactococcus lactis a la Harina de Gusano de la Harina y Chapulín.....	55
7.3. Condiciones de Fermentación.....	63
7.3.1. Disminución de pH.....	64
7.3.2. Porcentaje de Hidrólisis.....	66
7.3.3. Contenido de Proteína Amínica en el Extracto < 3 kDa.....	67
7.3.4. Cinéticas de Crecimiento, Parámetros Cinéticos y Concentración Celular Durante la Fermentación.....	69
7.4. Actividad Antioxidante.....	71
7.5. Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina.....	77
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Número de insectos comestibles por país.....	17
2	Distribución de insectos comestibles en México.....	18
3	Problemas ambientales involucrados cuando los insectos se cosechan o cuando se crían como animales de producción o mini ganado.....	21
4	Especies de insectos consumidos en el mundo.....	22
5	Desafíos que enfrenta la industria de alimentos para asegurar el consumo de insectos.....	25
6	Métodos de obtención de péptidos bioactivos.....	30
7	Factores que influyen en las actividades biológicas de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática.....	31
8	Componentes del sistema proteolítico de las bacterias.....	33
9	Cinéticas de crecimiento de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 y 5% de dextrosa.....	57
10	Cinéticas de crecimiento de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 adicionado con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 / 5% de dextrosa.....	58
11	Cinéticas de crecimiento de <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 y 5% de dextrosa.....	59
12	Cinéticas de crecimiento de <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 adicionado con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 / 5% de dextrosa.....	60
13	Cinéticas de crecimiento de tres pases de pre adaptación de a) <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 con harina de gusano de la harina; b) <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 con harina de chapulín; c) <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con harina de gusano de la harina; d) <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con harina de chapulín.....	62
14	Contenido de proteína amínica, expresada en mg/mL, en el extracto crudo de chapulín y tenebrio antes y después de sonicación.....	64
15	Disminución de pH durante la fermentación de gusano de la harina y chapulín por <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	65
16	Porcentaje de hidrólisis de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	67
17	Contenido de proteína amínica en la fracción < 3 kDa de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	68

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
18	Cinéticas de crecimiento de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572 en presencia de proteína de gusano de la harina y chapulín, antes (A) y después (D) de su pre-adaptación.....	69
19	Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$ Eq de Trolox / mL) por el método DPPH, de extractos de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	73
20	Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$ Eq de Trolox / mL) por el método TEAC de extractos de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	74
21	Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$ Eq de Trolox / mL) por el método ORAC, de extractos de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	75
22	Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$ Eq de Trolox / mL) por el método FRAP, de extractos de gusano de la harina y chapulín fermentado con <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572.....	76

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Insectos consumidos en el mundo.....	17
2	Bioactividades evaluadas de péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática a partir de insectos.....	34
3	Bioactividades de péptidos bioactivos obtenidos mediante la fermentación de insectos.....	36
4	Porcentaje de harina y dextrosa usados para los tratamientos (A-F) de selección de las condiciones de fermentación.....	45
5	Mezcla de reacciones para ensayo de inhibición de actividad de ECA.....	52
6	Parámetros cinéticos de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 y 5% de dextrosa.....	56
7	Parámetros cinéticos de las cinéticas de crecimiento de 3 pases para la pre-adaptación de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 a la harina de chapulín.....	57
8	Parámetros cinéticos de <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 y 5% de dextrosa.....	58
9	Parámetros cinéticos de <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 y 5% de dextrosa.....	59
10	Parámetros cinéticos de las cinéticas de crecimiento de 3 sub-cultivos para la pre-adaptación de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 a la harina de gusano de la harina y chapulín.....	61
11	Parámetros cinéticos de las cinéticas de crecimiento de 3 pases de pre-adaptación de <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 con proteína de gusano de la harina y chapulín.....	61
12	Concentración celular de los tres sub-cultivos de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B 50572 después de 5 h de incubación (30 °C) en medio M17 adicionado con 0.5% de harina de gusano de la harina/chapulín y 3.5 % dextrosa en las tres curvas de pre-adaptación.....	63
13	Parámetros cinéticos de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572 con harina de gusano de la harina y chapulín durante la fermentación.....	70
14	Concentración celular de <i>L. lactis</i> NRRL B-50571 y B-50572 con harina de gusano de la harina y chapulín durante la fermentación.....	70
15	Contenido de polifenoles en gusano de la harina y chapulín fermentados con <i>L. lactis</i> NRRL B-50572 y B-50572.....	71

## RESUMEN

En los últimos años se ha observado un creciente interés en la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de insectos, debido a que se ha reportado pueden tener efectos (e.g., antihipertensivos, antidiabéticos y antioxidantes) en la salud. La obtención de péptidos bioactivos de insectos por fermentación con BAL ha sido poco explorada. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) de extractos solubles en agua obtenidos a partir de harinas de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) (HGH) y de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) (HCH) fermentadas por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 o B-50572. Primero, las cepas fueron pre-adaptadas a las condiciones de fermentación. Posteriormente, las harinas inoculadas con las bacterias se fermentaron por 24, 48 o 72 h a 30 °C. Se registró el pH, se obtuvieron los extractos solubles, y se les determinó el grado de hidrólisis. Posteriormente, se obtuvieron fracciones <3 kDa, y se determinaron el contenido de proteína y la capacidad antioxidante (TEAC, DPPH, ORAC y FRAP), e IECA. Los resultados mostraron que las mejores condiciones de pre-adaptación fueron con una concentración de dextrosa de 3.5% y de proteína de 0.5%. Se registró una disminución ( $p<0.05$ ) del pH a las 24 h, sin cambio ( $p>0.05$ ) a las 48 y 72 h. Adicionalmente, se observó incremento ( $p<0.05$ ) de la proteína amínica y el grado de hidrólisis de 0.2 y 0.42% para la HCH y HGH, respectivamente. Se observó un incremento ( $p<0.05$ ) en la actividad antioxidante por los métodos TEAC, ORAC y DPPH, para las fracciones de los dos tipos de harina fermentada con las cepas de estudio, mientras que por FRAP, sólo se observó para la fracción de HGH con ambas cepas. En contraste, la actividad disminuyó para la fracción HCH. En general, la mayor capacidad antioxidante se observó en las fracciones de harina de HCH fermentadas durante 24 h por *L. lactis* NRRL B-50572. La actividad IECA de las fracciones de harina de ambos insectos se evaluó a las 24 h de fermentación con la cepa B-50572. La fracción de HGH presentó un  $IC_{50}$  de 1.34 mg/mL, mientras que la de HCH un  $IC_{50}$  de 0.78 mg/mL. Los resultados encontrados en este estudio muestran el potencial uso de cepas específicas de *Lactococcus lactis* para la fermentación de insectos y la generación de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antihipertensiva.

**Palabras Clave:** Insectos, fermentación, actividad antioxidante, *Lactococcus lactis*, péptidos bioactivos.

## ABSTRACT

In recent years, there is growing increasing interest in the production of bioactive peptides from insect proteins, due to their reported health effects such as antihypertensive, anti-diabetic, and antioxidant activity. Several microorganisms have been used for the fermentation process that leads to generation of bioactive peptides. However, few studies have been reported on the use of lactic acid bacteria in insect fermentation. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antioxidant activity and inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE) of the water-soluble extracts obtained from mealworm (*Tenebrio molitor*) (GH) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) (CH) fermented by *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and B-50572. First, the strains were pre-adapted to the fermentation conditions with different percentages of insect flour and dextrose. Subsequently, both insect samples were inoculated individually with each of the bacteria strains and allowed to fermented for 24, 48 or 72 h at 30 °C. At the end of the respective fermentation times, the pH was recorded, and the soluble extracts were obtained, for which the degree of hydrolysis was determined. Fractions <3 kDa were obtained, and the protein content and antioxidant capacity (TEAC, DPPH, ORAC and FRAP) and ACE inhibitory activity was measured. The results showed that the best pre-adaptation conditions were a dextrose concentration of 3.5% (v/v) and a protein concentration of 0.5% (w/v). In the fermented samples, the pH decreased ( $p < 0.05$ ) to 4.0 at 24 h without changing ( $p > 0.05$ ) at 48 and 72 h. Additionally, an increase ( $p < 0.05$ ) in amine protein and degree of hydrolysis of 0.2 and 0.42% was observed for CH and GH flour, respectively, fermented with both bacteria. Antioxidant activity increased ( $p < 0.05$ ) in TEAC, ORAC and DPPH, respectively, for the two insect samples and both bacteria strains, while in FRAP the increase was only observed for GH with both bacteria strains; while, for CH the FRAP activity decreased during fermentation. Likewise, the highest antioxidant activity was observed in CH samples fermented for 24 h by *L. lactis* NRRL B-50572. Regarding the ACE inhibitory activity, both insects were evaluated at 24 h of fermentation with strain B-50572, GH presenting of  $IC_{50}$  of 1.34 mg/mL whereas CH  $IC_{50}$  of 0.78 mg/mL. The results found in this study show the potential use of *Lactococcus lactis* strains for insect fermentation and the generation of bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive activity.

**Key Words:** Insects, fermentation, antioxidant activity, *Lactococcus lactis*, bioactive peptides.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha incrementado el interés por el uso de los insectos comestibles como una fuente alternativa de alimentos, debido a su alto valor nutritivo y a que puede contribuir a la seguridad alimentaria, un problema a nivel mundial (FAO, 2017; Jongema, 2012). Los insectos han demostrado ser una fuente alternativa de proteínas de calidad, que pueden utilizarse en la elaboración de alimentos, por lo que el cultivo de insectos ha aumentado considerablemente, y se prevé que para el año 2023, se genere un aumento en las ganancias de los países productores (Hurtado *et al.*, 2018; Wageningen University & Research, 2018).

Adicionalmente, se ha considerado que los insectos, por su alta concentración de proteína, pueden ser una buena fuente de péptidos bioactivos con efectos positivo en la salud de quien los consume (Vercruyse, *et al.*, 2009; Zielińska, *et al.*, 2018; Hall *et al.*, 2018). En este sentido, diversos estudios han demostrado que la hidrólisis enzimática de proteínas de insectos, como el gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), gusano de la hoja de algodón (*Spodoptera littoralis*), langosta (*Schistocerca gregaria*) y grillo (*Grylloides sigillatus*; *Acheta domesticus*) puede liberar péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética (Vercruyse *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2017; Hall *et al.*, 2018; Mishyna *et al.* 2019).

Por otra parte, la fermentación de insectos con diferentes microorganismos es otra tecnología que se ha utilizado para la generación de péptidos bioactivos. Por ejemplo, se han utilizado diversos microorganismos tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus*, y *Staphylococcus xylosus*, para favorecer la liberación de dichos péptidos (Cho *et al.*, 2018) y compuestos aromáticos que generan sabores específicos; además, los compuestos que se generan son más fáciles de digerir y con una mayor biodisponibilidad en el sistema digestivo (Yi *et al.*, 2016; Mouritsen *et al.*, 2017).

De los diversos microorganismos que se han utilizado para la fermentación de distintas matrices proteicas, *Lactococcus* es uno de los géneros de BAL que se han destacado por sus características de fermentación y producción de péptidos bioactivos. Diversos estudios han demostrado que leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis* aisladas de productos lácteos artesanales tienen la capacidad de liberar péptidos con actividad antioxidantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012; Beltrán-Barrientos *et al.*, 2018).

Sin embargo, no se ha explorado la capacidad de éstas cepas para fermentar proteína de insectos y liberar péptidos con actividad antioxidante y/o inhibidores de la ECA. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de los extractos acuosos < 3 kDa obtenidos de la fermentación de harina de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) empleando cepas específicas de *Lactococcus lactis*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Insectos: Características Generales y Distribución Geográfica

Los insectos, del latín *insectum* “con cuerpo con muescas o dividido”, pertenecen al grupo de artrópodos y se caracterizan por poseer un exoesqueleto quitinoso, su cuerpo está dividido en tres partes (cabeza, tórax y abdomen), tienen tres pares de patas articuladas, ojos compuestos y dos antenas. Se estiman que existen entre 6 y 10 millones de especies a nivel mundial, y tienen la capacidad de adaptarse fácilmente a las condiciones ambientales (Van Huis *et al.*, 2013; Gullan *et al.*, 2014).

En los ecosistemas terrestres representan una gran parte de la biomasa, además cumplen un papel fundamental en el control biológico, polinización y bioconversión de material orgánico en descomposición. Es así que, entre todas las especies conocidas más del 75% son insectos y se caracterizan por ser de tamaño pequeño, requiriendo poco espacio para su crianza y una cantidad de alimento menor en comparación con otros animales como el ganado y aves (Van Huis *et al.*, 2013; Gullan *et al.*, 2014).

Adicionalmente, un gran porcentaje de insectos forman parte de la gastronomía de muchos países debido a su composición nutrimental (Van Huis *et al.*, 2013; Gullan *et al.*, 2014), por lo que, los insectos comestibles son un recurso renovable natural comúnmente consumidos por un tercio de la población mundial, siendo América Latina, África, Asia y algunas partes de Australia, donde principalmente se consumen (Figura 1) (Wageningen University & Research, 2018) (Ramos-Elourdy, 2007; Van Huis *et al.*, 2013).

Recientemente en América del Norte ha aumentado el interés por el consumo de insectos, mientras que en otras partes del mundo son consumidos normalmente, tal y como se muestra en el Cuadro 1.

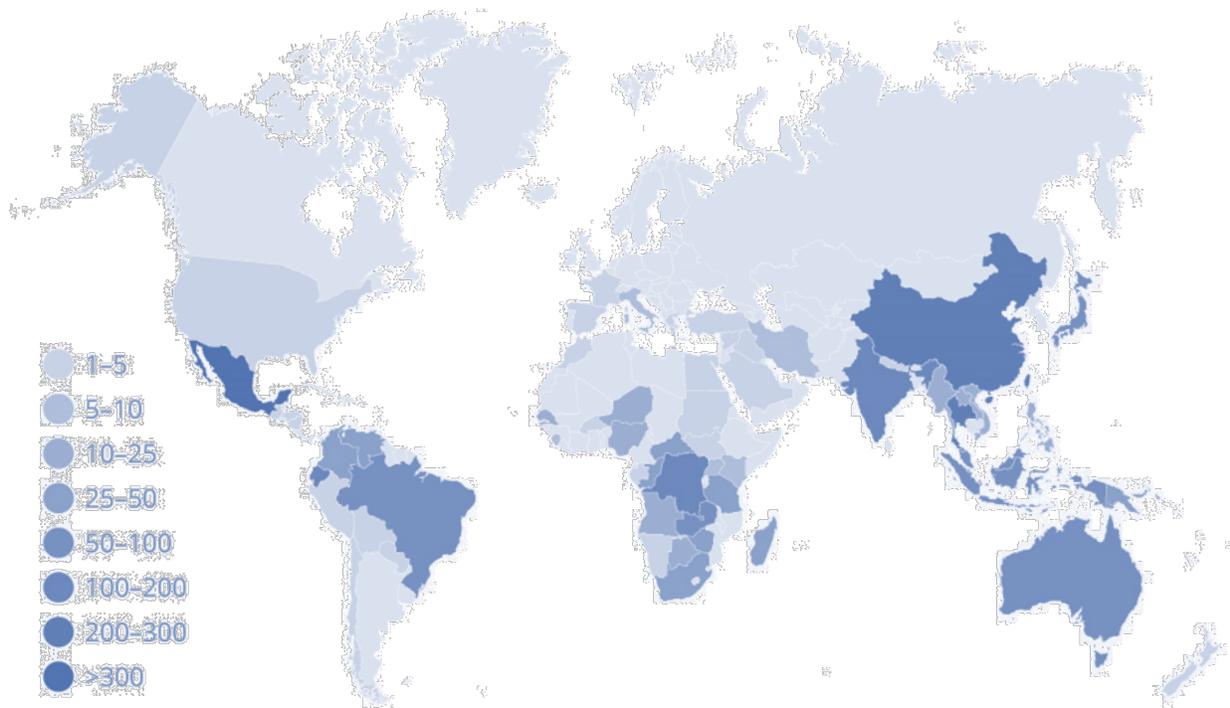


Figura 1 Número de insectos comestibles por país. Fuente: Centro de Información Geográfica. Universidad de Wageningen, basada en datos compilados por Jongema, 2012.

Cuadro 1 Insectos consumidos en el mundo

País	Insecto	Referencia
<b>Diversas regiones circumpolares del mundo (Groenlandia, Canadá, Estados Unidos y el este de Rusia)</b>	Moscas <i>Hypoderma (Oedemagena) tarandi</i> (L.) y <i>Cephenemyia trompe</i> (M.)	
<b>EE. UU.</b>	Grillo ( <i>Acheta domesticus</i> ), gusano de la harina ( <i>Tenebrio molitor</i> )	Halloran <i>et al.</i> , 2018
<b>India</b>	Alrededor de 80 especies de insectos comestibles.	
<b>Tailandia</b>	langostas, grillos, chinches gigantes de agua, orugas de bambú, escarabajos, larvas y hormigas del gorgojo de la palma	Hanboonsong <i>et al.</i> , 2010
<b>China</b>	20 especies de insectos	Feng <i>et al.</i> , 2018
<b>Australia</b>	Hormigas melíferas ( <i>Myrmecocystus</i> )	Quirce, Felippini y Micó, 2013

<b>Indonesia</b>	Saltamontes, grillo, termitas, larvas del gorgojo de la palma de sagú y de abeja
<b>Camboya</b>	Tarántulas gigantes
<b>España</b>	Saltamontes, grillos, crisálidas de gusanos de seda
<b>Argentina</b>	Orugas
<b>Francia</b>	Gusanos de la harina, moscas, grillos, saltamontes, hormigas
<b>África</b>	Termitas
<b>Vietnam</b>	Grillos
<b>Varios países</b>	Escorpiones, lombrices, mariposas, gusanos del bambú, cigarras

En México hay registro de 549 especies de insectos comestibles, los cuales son consumidos a lo largo del territorio mexicano (Figura 2), además son el alimento de muchos grupos étnicos, (Ramos-Elourdy, 2006).

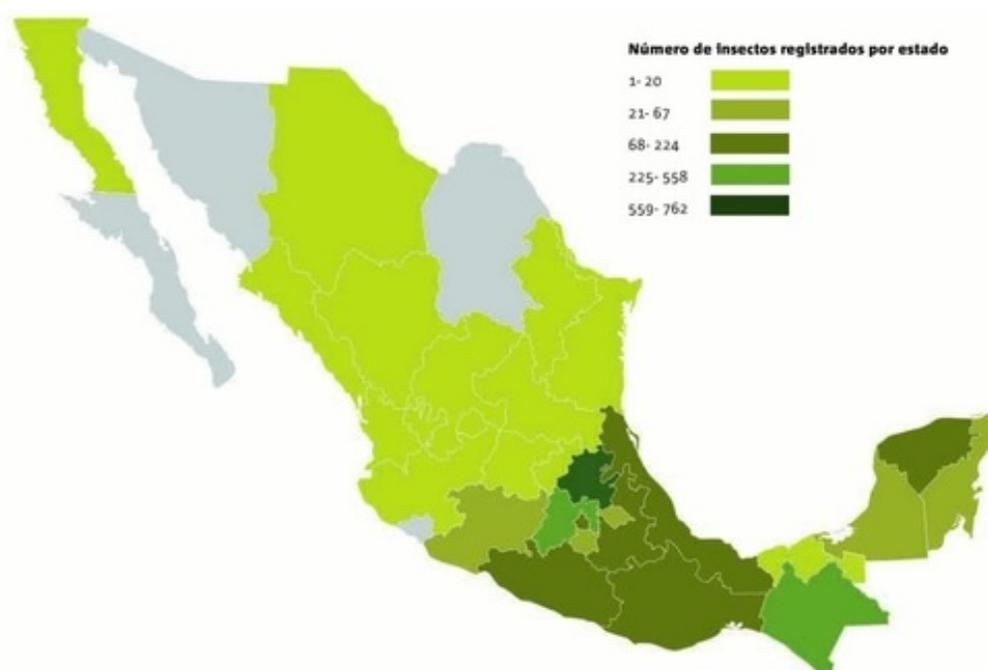


Figura 2. Distribución de insectos comestibles en México. Fuente: Ramos-Elourdy, 2006

Entre los insectos que se consume en México está el “gusano del mezquite” *Thasus gigas*, y las hormigas *Myrmecosistus melliger* y *M. mexicanus*, las cuales se encuentran en áreas planas de zonas áridas y sus nidos están bajo tierra. Otro insecto que se encuentra ampliamente distribuido en toda la República Mexicana es la avispa *Polybia Mocc. Nigratella* (Fernández, 1989; Ramos-Elourdy y Pino, 2003; Ramos-Elourdy, 2006).

Los escamoles (*Liometopum*), el gusano del agave blanco (*Aegiale hesperiaris* Walk.), larvas del gusano *Opuntia (Laniifera cyclades* D.), el gusano del maíz (*Helicoverpa zea* B.), el gusano soldado hormiga (*Spodoptera frugiperda* S.), gusano del agave rojo (*Xyleutes redtembacheri* Hamm.) y el gorgojo *Scyphophorus acupunctatus* son ejemplos de insectos consumidos en el estado de Hidalgo.

Mientras que en Oaxaca se consume el chapulín del género *Sphenarium*, en Hidalgo los *amues*, los jumiles (*Atisis Taxcoensis*) en Morelos y Guerrero, las hormigas chicatanas (*Atta mexicana*) en Chiapas y Veracruz, así mismo en Chiapas se consume la *cuetla*, que es la larva de la mariposa *Latebraria amphypiroides* (Ramos-Elorduy & Pino, 2001; Ramos-Elourdy, 2007).

Por otra parte, la producción de insectos de manera industrial en México, es reciente, y, entre los insectos que se comercializan se encuentran el gusano de la harina (*T. molitor*) (Optiprot®) (Carreño, D. 2020) y grillo (*Acheta domesticus*) (Griyum®) (Urrejola, J., 2019). Sin embargo, es de interés, evaluar cuál es el impacto ambiental que se genera, durante la producción de insectos comestibles.

## 2.2. Impacto Ambiental del Cultivo de Insectos

Investigaciones respaldan el potencial uso de los insectos como fuente de proteínas, que puedan contribuir para abastecer la necesidad de alimentos en el mundo. La producción de insectos, posee ventajas ambientales, en comparación con la producción de animales convencionales, pues su producción genera menos presión ecológica debido a que no contribuyen considerablemente a la emisión de gases de efecto invernadero, además de ser altamente sostenibles al necesitar menos cantidad de alimento, agua y suelo, disminuyendo así la erosión de la tierra; por otra parte

contribuyen a la seguridad alimentaria, debido a su consumo y a que pueden generar ingresos cuando son comercializados (Van Huis y Oonincx, 2017; Wendin *et al.*, 2019).

Por otra parte, a pesar del bajo impacto ambiental, generado durante su producción, es importante considerar cuáles son los problemas ambientales que se generan durante la misma (Figura 3).

Además, se ha reportado que los niveles de emisión ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ) directas e indirectas, producidas por los insectos, son más bajos que los reportados para ganado convencional. Todos estos factores, que evalúan el impacto que se puede generar al medio ambiente por cierto tipo de producto a lo largo de toda la cadena alimenticia, en este caso de los insectos, es mediante la evaluación del ciclo de vida (LCA, por sus siglas en inglés). Actualmente se conocen LCA del gusano de la harina, grillo doméstico, moscas soldado negro y moscas domésticas (Miglietta *et al.*, 2015; Smetana *et al.*, 2016, Halloran *et al.*, 2017).

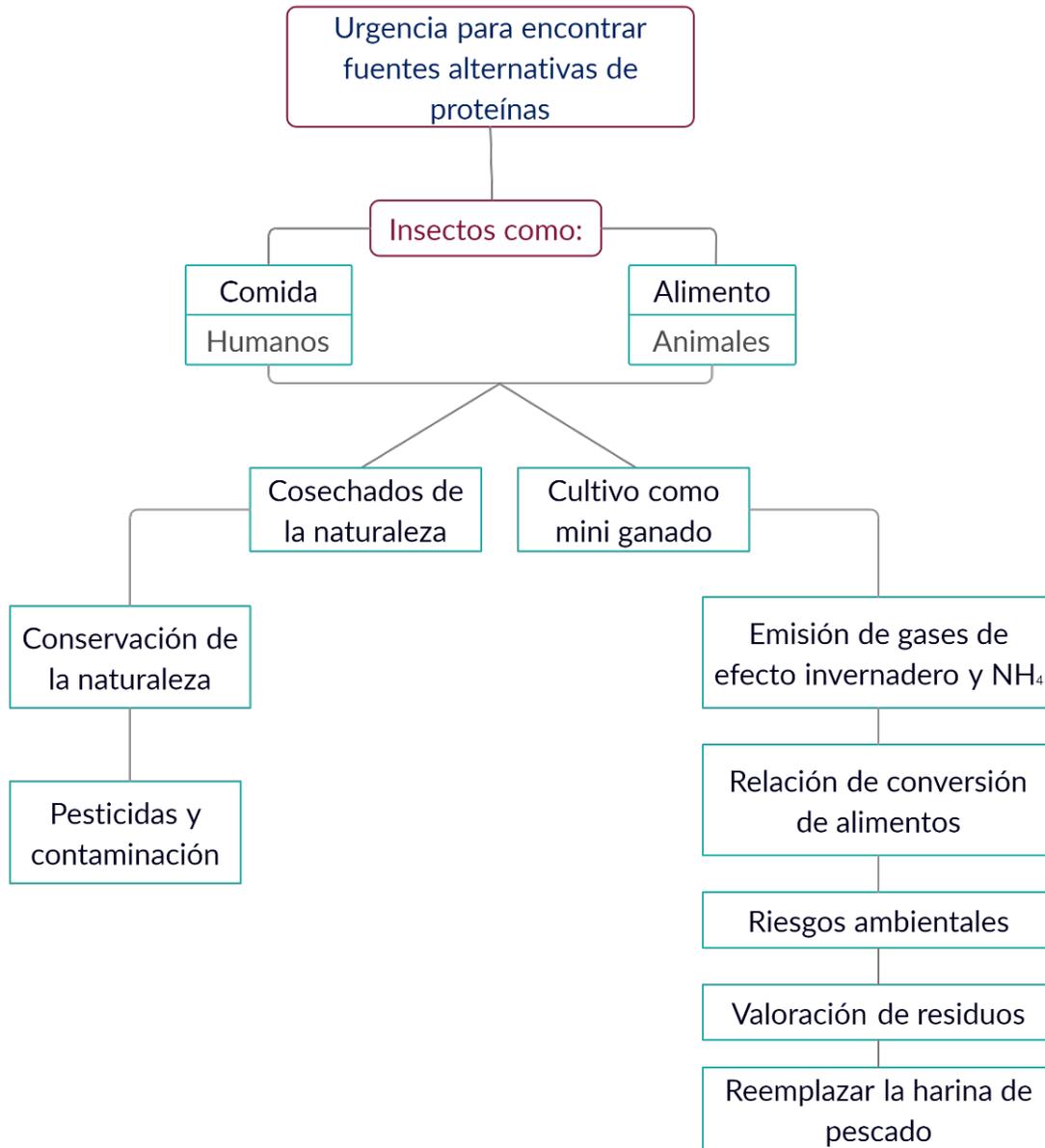


Figura 3. Problemas ambientales involucrados cuando los insectos se cosechan o cuando se crían como animales de producción o mini ganado. Adaptado de: Van Huis y Oonincx, 2017.

### 2.3. Insectos Comestibles y su Valor Nutricional

Desde siglos atrás los insectos comestibles han desempeñado un papel importante en distintas culturas alrededor del mundo. Estos han tenido impacto en diversos aspectos relacionados con las tradiciones, la medicina, la auto conservación y la alimentación humana (Meyer-Rochow, 2009;

Costa-Neto y Dunkel, 2016).

La entomofagia (consumo de insectos en la dieta), se ha reportado en 130 países, siendo esenciales en las dietas de aproximadamente 3071 grupos étnicos (Costa-Neto y Dunkel, 2016), y una práctica frecuente en al menos dos mil millones de personas alrededor del mundo (Van Huis *et al.*, 2013; Pal y Roy, 2014).

Existen alrededor de 2000 especies de insectos comestibles, de los cuales los escarabajos (Coleóptera), orugas (Lepidóptera), abejas, avispas y hormigas (Himenóptera) son los más consumidos a nivel mundial (Figura 4) (Jongema, 2012).

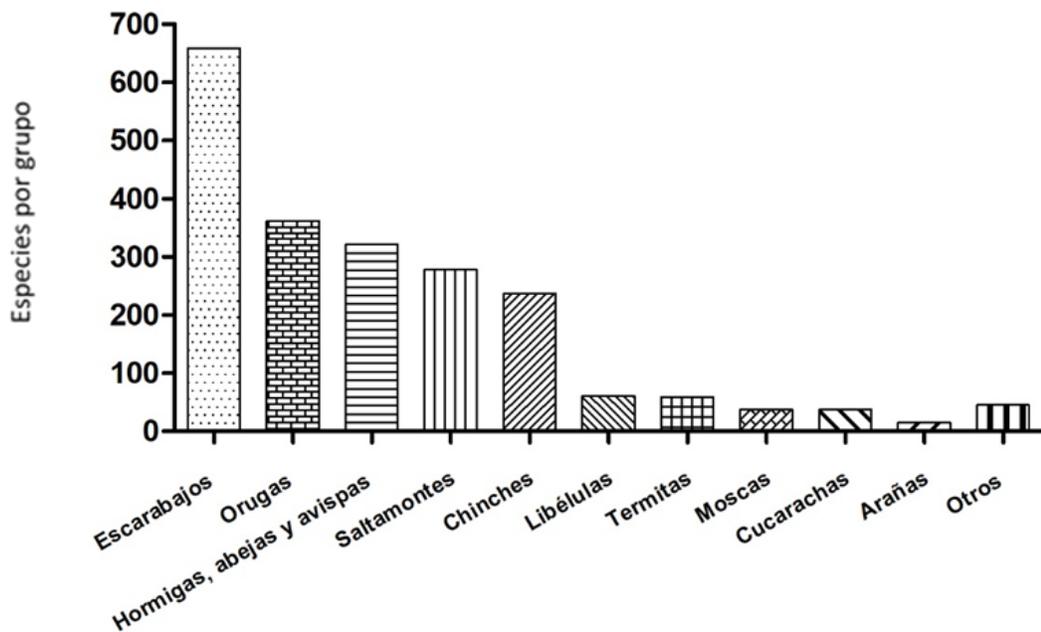


Figura 4. Especies de insectos consumidos en el mundo. Fuente: Jongema, 2012.

En este sentido, debido a la gran diversidad de especies, la composición nutrimental es diferente y están en función de la especie, etapa metamórfica, hábitat y factores de reproducción como la dieta, temperatura, agua y la ubicación geográfica, así como del procesamiento del insecto para su consumo, el cual puede modificar su valor nutrimental (FAO, 2017; Wendin *et al.*, 2019).

Entre los principales componentes nutricionales, el contenido de proteína, es uno de los más altos el cual varía entre 20 y 70% (base seca), y generalmente contienen una alta proporción de

aminoácidos esenciales, seguido de las grasas, las cuales presentan una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y contienen omega 3 y 6, además contienen fibra, minerales como el magnesio y el hierro, vitaminas como la D y B12. Son ricos en micronutrientes como el cobre, manganeso, fósforo, selenio y zinc, contienen riboflavina, ácido pantoténico, biotina y algunos insectos tienen ácido fólico, dichos componentes los hacen muy atractivos para su consumo en la alimentación humana, y son comparables con otras fuentes de proteínas como la carne, el pescado y la soya (Rumpold y Schlüter, 2013; Jongema, 2012; FAO, 2017; Wendin *et al.*, 2019).

Por otra parte, los insectos contienen quitina en su exoesqueleto, la cual representa el 10% de la biomasa total, y ésta puede ser considerada como fibra dietética en nuestro metabolismo (Muzzarelli *et al.*, 2012), ya que se han encontrado la presencia de quitinasas en jugos gástricos de humanos; así como AMCase y quitotriosidasas, pertenecientes a la familia de las 18 glicosilhidrolasas (Paoletti *et al.*, 2007; Muzzarelli *et al.*, 2012), por lo que los insectos comestibles se pueden considerar como una fuente valiosa de fibra.

La composición nutricional de los insectos, ofrece una alternativa como fuente de proteína, con el fin de satisfacer la demanda de la población, ya que se prevé que para el año 2050, la población alcanzará cifras de aproximadamente diez millones de personas. Debido a esto, la demanda de alimentos irá incrementando constantemente, haciendo necesario el uso de otras fuentes alternativas de proteína, ya que el aumento de la producción agrícola será tan solo del 70%, mientras que la demanda mundial de alimentos será de un 100% (Wendin *et al.*, 2019). A pesar de que los insectos pueden ser una fuente alternativa de proteína para consumo humano, éstos deben cumplir con la legislación de cada país para poder ser comercializados y consumidos.

## 2.4 Legislación

La regulación sobre la producción de alimentos es amplia en todos los países, sin embargo, las regulaciones sobre los insectos como alimento aún son escasas y varía de acuerdo a cada país, lo cual puede ser un obstáculo para el desarrollo de la industria de alimentos basados en insectos (Van Huis *et al.*, 2013).

En Europa, de acuerdo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, los

insectos son considerados como nuevos alimentos una vez que estos se hayan avalado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y aprobada por la Comisión Europea (Zielińska, *et al.* 2018; Wendin *et al.*, 2019).

En suiza, sólo el grillo (*Acheta domestica*) y langosta (*Locusta migratoria*), en etapa adulta, y gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) en etapa larvaria, pueden ser comercializados enteros o en harina (FOAG, 2017). Mientras que, en Australia y Nueva Zelanda, el comité asesor de normas alimentarias sobre “Novel foods” (ACNF) permite el consumo de súper gusano de la harina (*Zophobas morio*), grillo de casa (*Acheta domestica*) y gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) (FSANZ 2018).

En Canadá la normatividad expuesta por el ministerio de salud establece que los insectos que no tienen historial de uso seguro como alimento (consumo reciente) pueden ser considerados como “nuevos alimentos”, y deberán ser evaluados como tal, mientras que los insectos que no se consideran “nuevos alimentos” se pueden ofrecer a la venta a los consumidores, siempre y cuando cumplan con lo establecido por la Ley y Reglamentos de Alimentos y Drogas (Secciones 4, 5 y 7 de la Ley y la División 28 del reglamento) (Halloran *et al.*, 2018).

En México, por el contrario, los insectos se consumen y comercializan ampliamente en la mayor parte del territorio mexicano, y hasta el momento no existe una reglamentación respecto al cultivo, comercialización y consumo (Elourdy, Pino, y Conconi 2006). Además de contar con una regulación para su producción y consumo, es importante garantizar que el consumo de insectos sea inocuo y no cause algún daño potencial al consumidor.

## 2.5. Aspectos de Seguridad en el Consumo de Insectos

Para asegurar que el consumo de insectos es inocuo y seguro, es necesario evaluar los posibles efectos adversos que estos pudieran generar al consumidor, puesto que el consumo de insectos es una práctica que se ha ido extendiendo como una nueva tendencia en ciencias de la alimentación, teniendo su mayor expansión desde el año 2013, posterior a que la FAO y WUR publicara "Insectos comestibles: perspectivas futuras para la seguridad alimentaria y la alimentación" (Van Huis *et al.*, 2013); desde entonces, el número de publicaciones referentes a insectos ha aumentado

considerablemente, sin embargo, a pesar de la basta información que existe sobre los beneficios de los insectos, se encuentran algunos aspectos de inocuidad y alergenicidad, que complican su propagación (Gere *et al.*, 2019).

Cuando se habla de insectos comestibles y su inocuidad, las autoridades de seguridad alimentaria afrontan nuevos desafíos, debido a que algunas de las especies de insectos pueden presentar riesgos potenciales a la salud del consumidor, tales como químicos, biológicos (microbianos y parasitarios) o alérgicos (Figura 5). Por otra parte, se encuentra el hecho de que los insectos pueden ser alimentados con casi todo (desde desechos hasta alimentos preparados (Belluco *et al.*, 2013; Gere *et al.*, 2019).

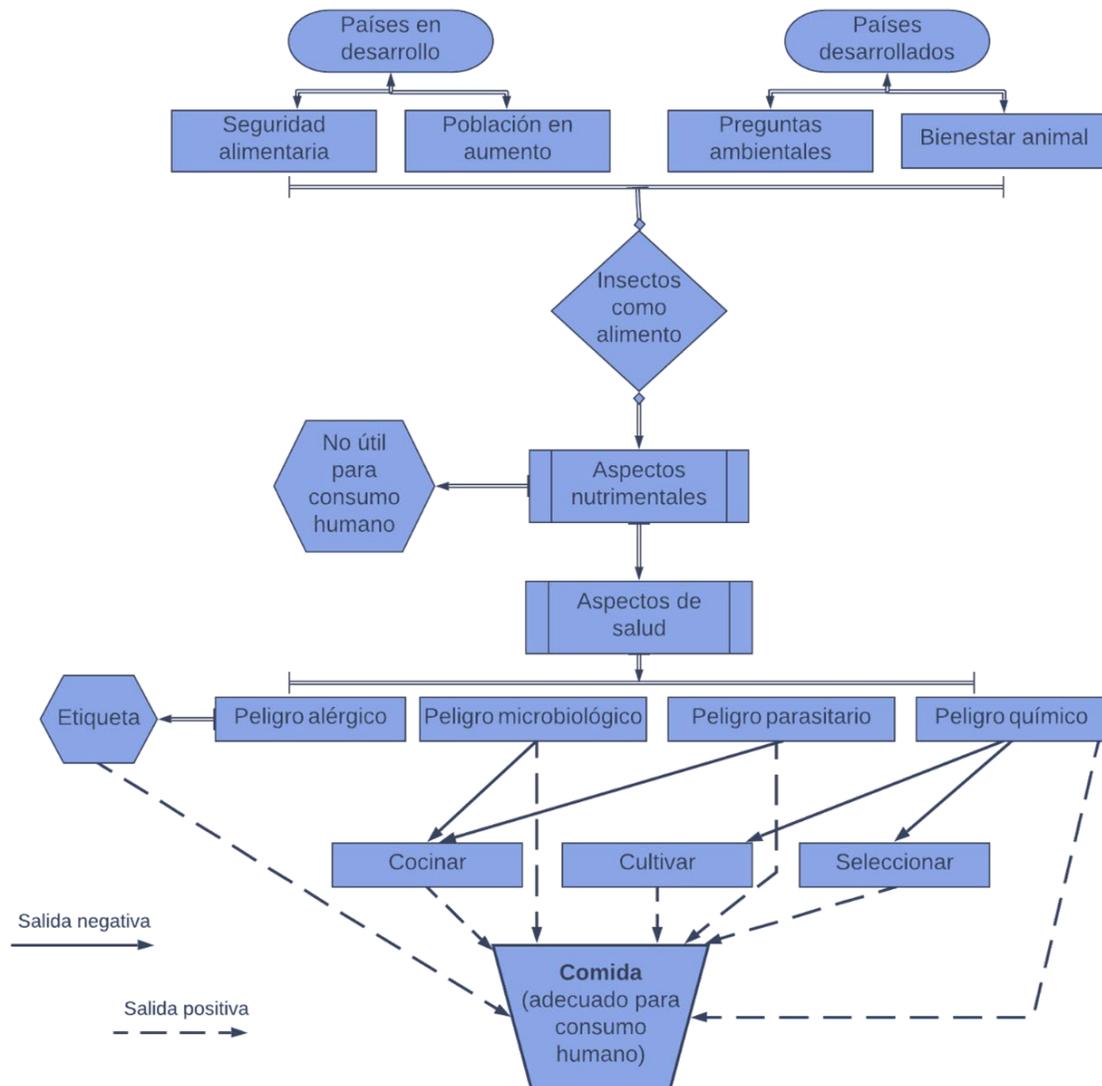


Figura 5. Desafíos que enfrenta la industria de alimentos para asegurar el consumo de insectos. Adaptado de Belluco et al., (2013)

Han *et al.* (2014), evaluaron la genotoxicidad del polvo liofilizado de gusano de la harina utilizando un modelo con ratas Sprague-Dawley (SD) machos y hembras y se observó que el consumo de 3 g/kg de peso corporal/día no provocó cambios significativos en la mutación inversa, aberración cromosómica (*in vitro* en células de pulmón de hámster chino) y en micronúcleos (*in vivo* en ratones). Adicionalmente, no se observó cambios en células epiteliales, glóbulos rojos y glóbulos blancos, así como daño en los órganos. Por lo que el consumo de dicho insecto, en las condiciones estudiadas, no representa un riesgo a la salud.

Por otra parte, las reacciones de alergenicidad que pudiera presentarse por el consumo de insectos es debido a que algunas especies contienen proteínas de tipo tropomiosinas, las cuales reaccionan

de forma cruzada similar a las reacciones alérgicas provocadas por una proteína miofibrilar presente en camarones y crustáceos (Palmer, 2016). Dicha proteína miofibrilar es un alérgeno que consta de un dímero en espiral de 35-38 kDa; además se ha reportado una identidad en la secuencia de la tropomiosina (75-85 %) presente en ácaros y en algunos artrópodos como el grillo (Pedrosa *et al.*, 2015).

Así mismo se han identificado otros alérgenos menores de artrópodos, tales como la cadena ligera de miosina, fructosa bifosfato aldolasa, actina, enolasa,  $\alpha$ -tubulina y la  $\beta$ -tubulina (Phiriyangkul *et al.*, 2015; Van Broekhoven *et al.*, 2016).

Se ha evaluado la reacción cruzada de IgE en muestras de gusano de la harina (*T. molitor*, *Zophobas* (*Zophobas atratus*) y coleóptero de la cama (*Alphitobius diaperinus*) después ser tratadas térmicamente y de ser sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal. Los resultados mostraron reactividad cruzada con tropomiosina,  $\alpha$ -amilasa o arginina quinasa demostrando así que las personas alérgicas a los ácaros del polvo o a los crustáceos, pueden estar en riesgo al consumir éstos tipos de insectos, puesto que, aunque el procesamiento con calor y la digestión *in vitro* disminuyeron la reacción cruzada, no la eliminaron (Van Broekhoven *et al.*, 2016).

También se ha evaluado el potencial alergénico de la langosta de Bombay (*Patanga succincta*) antes y después de un proceso de cocción (fritas). Cuando la langosta se sometió al proceso de freído se observó la presencia de hexamerina, piruvato quinasa, enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como alérgenos, mostrando así el efecto que puede tener el procesamiento térmico en la alteración de alergenicidad de los alérgenos presentes en los insectos (Phiriyangkul *et al.*, 2015).

De igual manera, se evaluó la alergenicidad de hidrolizados de proteína de grillo. Proteínas de grillos no hidrolizados o parcialmente hidrolizados (15 a 50%) reaccionaron positivamente a la tropomiosina, mientras que a mayor porcentaje de hidrólisis (60 a 85%) no presentaron tal reacción. Estos resultados indicaron que a mayor grado de hidrólisis disminuye el efecto alergénico (Hall *et al.* (2018).

Además, Stull *et al.* (2018) mediante un ensayo cruzado aleatorio doble ciego, evaluaron el efecto del consumo de 25 g de polvo de grillo/día en la composición de la microbiota intestinal, seguridad y tolerancia al consumo. Observaron que el consumo de grillo es tolerable y no tóxico a la dosis estudiada, de acuerdo a los parámetros de signos clínicos, peso corporal y de órganos, consumo de alimentos, oftalmología, análisis de orina, hematología, química del suero y examen

histopatológico. Así mismo observaron el aumento de la bacteria probiótica *Bifidobacterium animalis*, la cual aumentó 5.7 log durante el consumo del polvo de grillo, así mismo relacionaron su consumo con la reducción de TNF- $\alpha$  en plasma, sugiriendo que el consumo de grillo puede ayudar a mejorar la salud intestinal y a reducir la inflamación sistémica.

Por lo anterior, los insectos podrían ser una alternativa de proteínas en la formulación de alimentos, contribuyendo así a la seguridad alimentaria.

## 2.6. Incorporación de los Insectos en la Industria de Alimentos

A pesar de que el consumo de carne es de gran importancia por sus proteínas y otros nutrientes, en los últimos años, ha surgido el interés en buscar nuevas alternativas de proteína que sustituyan a la carne, puesto que es uno de los mayores contribuyentes del cambio ambiental, en cuanto a emisiones de gases de efecto invernadero, uso de la tierra y agua, además, se ha aumentado la preocupación por el bienestar animal, la salud humana y las direcciones de producción (Van der Weele, 2019).

Recientemente, la industria de los alimentos a explorado el uso de ingredientes alternativos que se semejan a la carne, tales como tejidos de animales poco convencionales (e.g., bisonte, avestruz), así como la carne cultivada y productos veganos (proteína de plantas y algas). Otra tendencia alimentaria que ha tomado gran relevancia es el consumo de insectos como alimento, debido a su aporte nutricional. Sin embargo, el consumo de alimentos que incluyan en su composición insectos es relativamente bajo y poco explorado (Van der Weele, 2019).

Entre los productos que han sido desarrollados a base de insectos se encuentran sustitutos de carne (concentración de 15 a 50% de materia seca), desarrollando así un producto similar a la carne en cuanto a textura, dureza y composición de proteínas. Otro producto fue elaborado a partir de 40% de proteína del gusano de la harina menor o escarabajo de la camada (*Alphitobius diaperinus*) con 5 o 10% de fibra de soya (materia seca), obteniendo una mezcla similar a la carne con 25 y 30.8% de contenido de proteína (Smetana *et al.* 2018).

Adicionalmente, la aceptabilidad de los productos ha sido evaluado. En un estudio realizado por Emergido *et al.* (2016), se evaluó la aceptación de cuatro mezclas de hamburguesas (carne de res /

lentejas / gusanos de la harina / carne de res, gusanos y lentejas), observando que la aceptación estaba influenciada por la apariencia y sabor, por lo que la hamburguesa a base de insectos recibió una calificación intermedia, y los panelistas mostraron una mayor preferencia por la hamburguesa de gusano de la harina y la de carne.

En México, recientemente ha aumentado el consumo de insectos integrados en alimentos de manera industrial. Uno de los ejemplos de empresas que comercializan insectos en forma de alimentos es Winkos<sup>®</sup>, empresa que crea botanas a base de harina de chapulín (*S. purpurascens*), así como Gricha<sup>®</sup>, empresa que comercializa galletas elaboradas con chapulín (*S. purpurascens*), por otra parte, se encuentran las empresas que distribuyen insectos en forma de harina, tales como Griyum<sup>®</sup>, que comercializa harina de grillo (*Acheta domesticus*) y OptiProt<sup>®</sup>, empresa que comercializa harina de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*).

Por otra parte, además del desarrollo de productos, los insectos pueden usarse como fuente de proteínas funcionales para uso en la industria de alimentos. Hall et al. (2017), demostraron que los hidrolizados de proteína de grillo (*Grylloides sigillatus*) presentan diversas propiedades tecno-funcionales. Los hidrolizados mostraron 30% de solubilidad a pH de 3 y 7 y un 50 a 90% a pH 8 y 10, (respecto al testigo no hidrolizado), mientras que el índice de actividad de emulsión se encontró entre 7 y 32 m<sup>2</sup> / g y la formación de espuma de 100 y 155% para todos los hidrolizados.

En otro estudio realizado por Mishyna et al. (2019), se evaluaron las propiedades funcionales de la proteína soluble de saltamontes comestibles (*Schistocerca gregaria*) y de abejas (*Apis mellifera*), las cuales fueron extraídas con tres métodos distintos, encontraron resultados similares de funcionalidad a los reportados por Hall et al. (2017), quienes observaron que los métodos de extracción modificaban las propiedades funcionales de las proteínas. Los autores encontraron que en los extractos con sonicación la mayor estabilidad de la emulsión se logró después de 120 minutos. La mayor estabilidad (74.1 %) de la espuma se encontró en las fracciones de extractos de saltamontes, obtenidos con soluciones alcalinas, mientras la estabilidad de la espuma fue de 55.5 % para la fracción de abeja obtenida por sonicación, a diferencia del polvo crudo y desgrasado, lo cual sugiere el potencial uso de los insectos para su aplicación en alimentos.

Zielińska, et al. (2017b) evaluaron las propiedades tecno-funcionales de las proteínas de tres especies de insectos comestibles, a saber, grillo casero tropical (*Grylloides sigillatus*), langosta del desierto (*Schistocerca gregaria*) y gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), obtenidas mediante hidrólisis con NaOH. Los resultados mostraron que la capacidad de retención de agua fue más alta

para las proteínas del gusano de la harina, mientras que la mayor capacidad de retención de aceite la presentó el hidrolizado del grillo casero, así mismo presentó la mayor capacidad de espuma, estabilidad de espuma y actividad emulsificante. Por otra parte, las proteínas de la langosta del desierto mostraron la mayor actividad de estabilidad de la emulsión.

Por otra parte, Purschke et al. (2018), observaron que la hidrólisis enzimática (por las proteasas: alcalasa, neutrasa, flavourzyme, papaína) de la langosta migratoria (*Locusta migratoria* L.) mejoraban las propiedades tecno-funcionales de la proteína, es decir, mayor actividad emulsionante, mayor capacidad de formación de espuma y capacidad de unión al aceite, lo cual demuestra su potencial uso en la industria de alimentos.

Los insectos además de ser una fuente de proteínas para consumo, éstos pueden ser también una fuente de obtención de péptidos bioactivos que puedan ejercer un efecto benéfico a la salud humana ya sea en forma de nutracéuticos o formando parte de un alimento funcional (Venegas - Ortega, *et al.*, 2019).

## 2.7. Insectos como Fuente de Péptidos Bioactivos

### 2.7.1. Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos son pequeñas secuencias de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos, que se encuentran encriptados de forma inactiva dentro de la secuencia de una proteína nativa, y que al ser liberados pueden presentar un efecto positivo en la salud (Karami y Akbari-adergani, 2019; Chauhan y Kanwar, 2020).

Los péptidos bioactivos son capaces de ejercer un papel importante en la regulación y modulación metabólica; ya que estos pueden desencadenar respuestas fisiológicas en el cuerpo influyendo en los efectos protectores contra algunas enfermedades y sus factores de riesgo, ya que se ha reportado que éstos, después de ser digeridos, pueden ser absorbidos en el intestino, entrar a circulación sistémica y llegar a través del torrente sanguíneo hasta la célula Diana donde ejercerán el efecto benéfico en el organismo (Erdmann, *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2018; Karami y Akbari-adergani, 2019).

Dichos péptidos pueden obtenerse mediante diversos procesos tales como síntesis recombinante de ADN (basada en el uso de técnicas de clonación y uso de ribosomas de los sistemas biológicos para la formación de péptidos), hidrólisis enzimática, química, y microbiana (Figura 6).

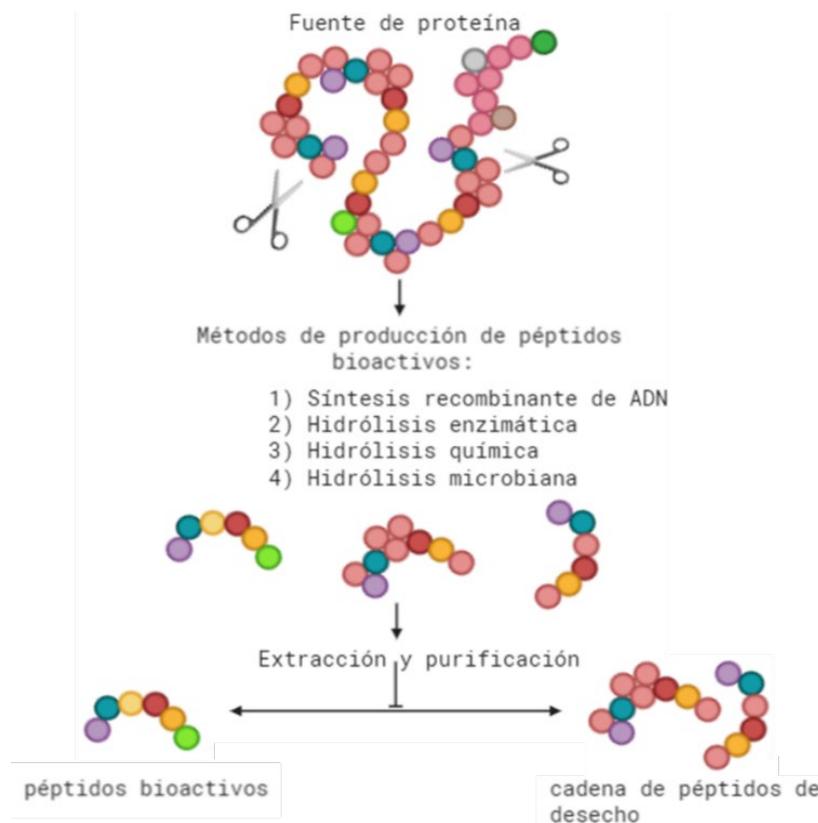


Figura 6. Métodos de obtención de péptidos bioactivos. Fuente: adaptado de Chauhan y Kanwar (2020).

#### 2.7.1.1. Métodos de obtención de péptidos bioactivos

Síntesis recombinante de ADN: la obtención de péptidos por la tecnología de ADN recombinante implica el uso de métodos modernos de clonación y expresión genética en microorganismos, tales como *E. coli*, *B. subtilis* y *B. megaterium*, que producen un péptido recombinante o muchos péptidos diferentes simultáneamente (Wang *et al.*, 2011).

Hidrólisis enzimática: Se utilizan enzimas de tipo proteasas, en forma inmovilizada o libre para la catálisis de los enlaces peptídicos. Algunas de las enzimas más utilizadas son quimiotripsina, pepsina, termolisina, papaína, tripsina y subtilisina (Boeriu *et al.*, 2010). Para éste método es

importante considerar diversos factores que pudieran influenciar en las actividades biológicas de los péptidos obtenidos (Figura 7).

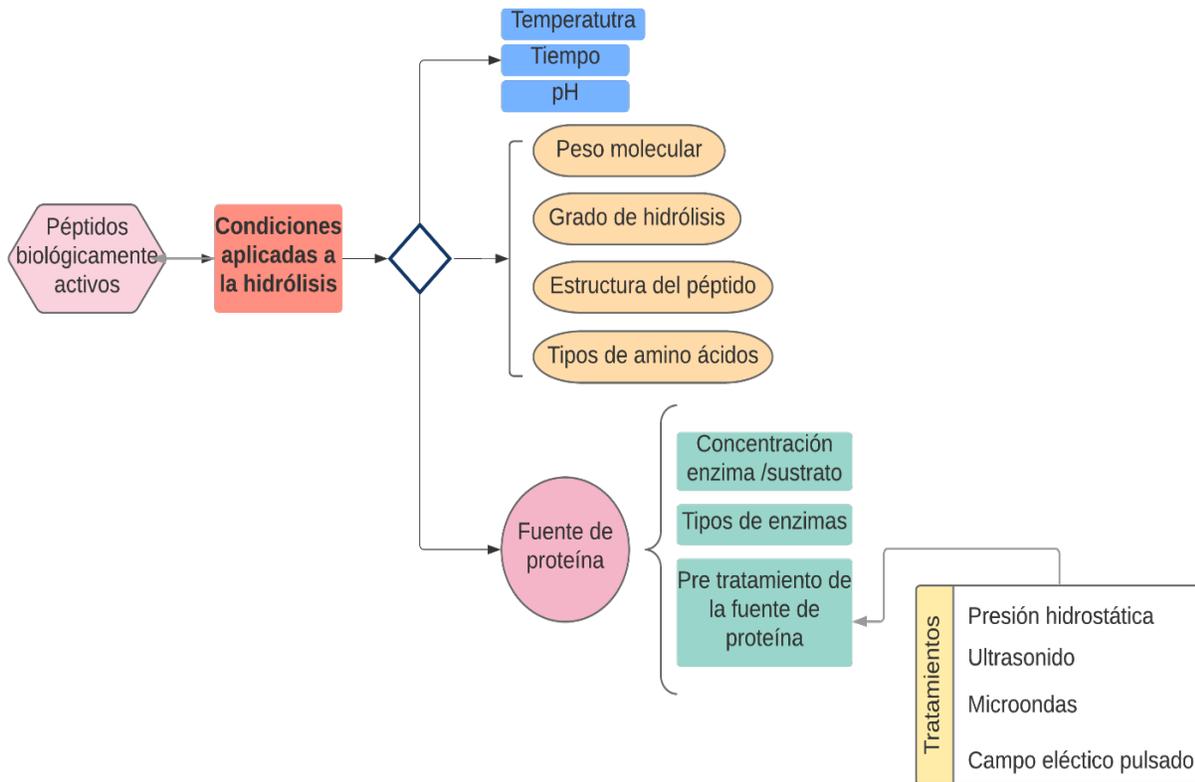


Figura 7. Factores que influyen en las actividades biológicas de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática. Adaptado de Karami y Akbari-adergani, 2019.

**Hidrólisis química:** Es el método más antiguo utilizado para la obtención de péptidos bioactivos, para lo cual se utilizan distintos reactivos químicos para la activación del grupo carboxilo (RCOOH) del aminoácido, que a su vez donará el grupo acilo (R- CO-) para la formación de enlaces peptídicos (Machado *et al.*, 2004).

**Fermentación:** En la obtención de péptidos bioactivos mediante fermentación se utilizan microorganismos en lugar de las enzimas purificadas, en donde la naturaleza del microorganismo utilizado determinará el tipo, cantidad y la actividad de los péptidos bioactivos que se producirán (Chauhan y Kanwar, 2020).

En este sentido, se han utilizado diversos tipos de microorganismos para la obtención de péptidos

bioactivos a partir de la fermentación de diversas matrices alimenticias, siendo las bacterias ácido lácticas las más utilizadas. El sistema proteolítico de las bacterias disminuye la complejidad de las proteínas para usarlas en su metabolismo, además, durante el proceso se generan péptidos simples los cuales pueden presentar diversas bioactividades (Daliri, *et al.*, 2017).

El sistema proteolítico de las BAL (Figura 8) consiste principalmente en: a) proteinasas de envoltura celular, que degradan la caseína extracelular (proteína de la leche) en oligopéptidos b) transportadores de péptidos que absorben los péptidos en la célula y c) diversas peptidasas intracelulares (Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006) mediante las cuales transforman los péptidos en péptidos más pequeños y aminoácidos, que utilizarán para llevar a cabo diversas funciones fisiológicas, como el control de pH intracelular, generación de energía metabólica, resistencia al estrés y biosíntesis de proteínas, así mismo, algunos de estos péptidos pueden presentar alguna bioactividad (Fernández y Zúñiga, 2006).

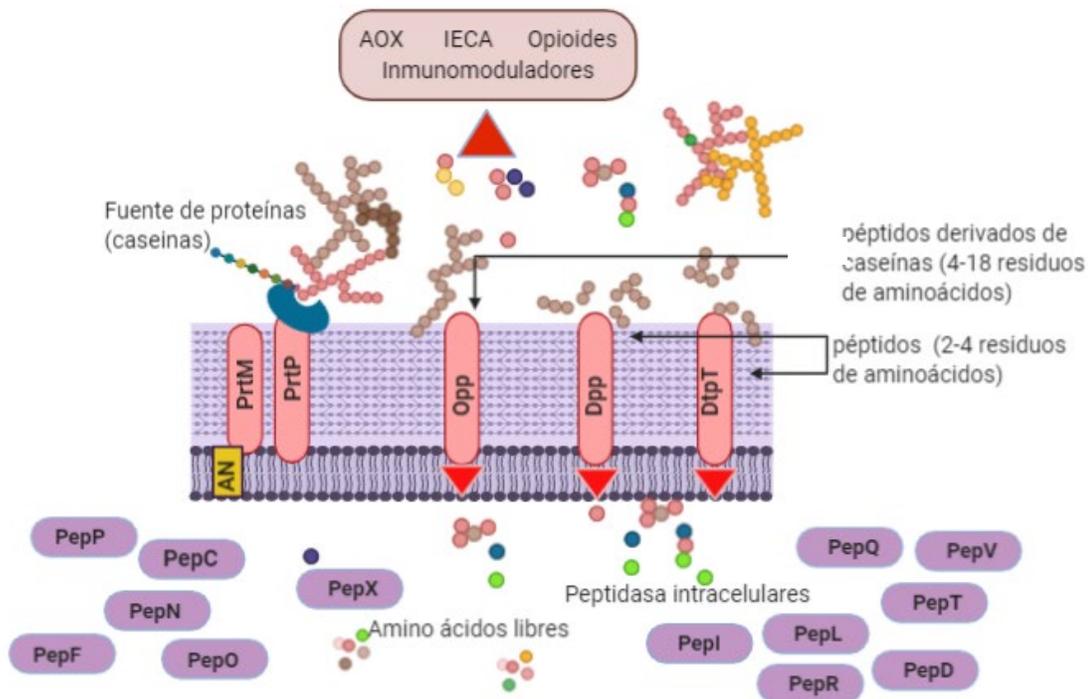


Figura 8. Representación esquemática del modo de acción del sistema proteolítico de los *Lactococcus* en las caseínas. PrtM, proteína responsable de la maduración de PrtP; PrtP, proteinasa de la pared celular. Sistemas de transporte peptídico: Opp, transportador de oligopéptidos; DtpT, transportador de di- y tripéptidos hidrofílicos; Dpp, sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofóbicos. Peptidasas intracelulares: endopeptidasas PepO y PepF; aminopeptidasas generales PepN y PepC; aminopeptidasas específicas PepX, PepP y PepL, iminopeptidasa PepI, tripeptidasa PepT, prolidasa PepQ, dipeptidasas PepD y PepV y prolinasa PepR. Adaptado de Savijoki *et al.*, (2006).

## 2.7.2. Péptidos Bioactivos de Hidrolizados de Proteínas de Insectos

Se han realizado diversos estudios para evaluar el potencial uso de las proteínas de insectos como fuente de péptidos bioactivos, siendo la hidrólisis enzimática el método de obtención más común. Los péptidos antihipertensivos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de la proteína de insectos, son los que más se han estudiado (Vercruyssen *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2017; Hall *et al.*, 2018). Adicionalmente, se han obtenido péptidos con otras bioactividades (Cuadro 2), como actividad antitumoral (Hu *et al.*, 2005), actividad antiobesogénica (Lee *et al.*, 2012) y actividad antioxidante (Yang *et al.*, 2013). Además, se han aislado péptidos antimicrobianos con un amplio espectro de actividad y con baja citotoxicidad (Otvos, 2000); lo cual demuestra el potencial uso de los insectos comestibles, los cuales podrían usarse en forma de nutraceuticos (e.g. cápsulas con péptidos bioactivos) o como ingredientes en alimentos funcionales.

Cuadro 2. Bioactividades evaluadas de péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática a partir de insectos.

Insecto	Enzima	Bioactividad evaluada	Referencia
<b>Grillo rayado (<i>Grylloides sigillatus</i>)</b>	alcalasa y digestión gastrointestinal simulada (pepsina, sales biliares y pancreatina)	actividad antioxidante, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV)	Hall <i>et al.</i> , 2018
<b>Larva de gusano amarillo de la harina (<i>Tenebrio molitor</i> L)</b>	alcalasa	Inhibición de la ECA	Dai <i>et al.</i> , 2013
<b>Cucaracha dubia (<i>Blaptica dubia</i>), Langosta migratoria (<i>Locusta migratoria</i>), cucaracha gigante de Madagascar (<i>Gromphadorhina portentosa</i>) y supergusano (<i>Zophobas morio</i>)</b>	digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> (pepsina, sales biliares y pancreatina)	Actividad antioxidante	Zielińska <i>et al.</i> , 2017a

<b>Larvas de gusano de la harina (<i>Tenebrio molitor</i>), langostas adultas (<i>Schistocerca gregaria</i>) y grillos adultos (<i>Grylodes sigillatus</i>), pre tratadas térmicamente</b>	digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> (pepsina, sales biliares y pancreatina) y absorción	Actividad antioxidante y antiinflamatoria	Zielińska <i>et al.</i> , 2017b
<b>Mosca doméstica (<i>musca domestica</i>)</b>	Alcalasa <sup>®</sup> y Flavourzyme <sup>™</sup>	Actividad antioxidante	Wang <i>et al.</i> , 2013
<b>Gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>)</b>	Alcalasa	Actividad antioxidante	Liu <i>et al.</i> , 2017
<b>Larvas de mosca soldado (<i>Hermitia illucens</i>)</b>	Alcalasa	Actividad antioxidante	Mintah <i>et al.</i> , 2019

### 2.7.3. Fermentación de Insectos

En los últimos años, la fermentación de insectos se ha usado para la elaboración de productos de consumo humano. Por ejemplo, Mouritsen *et al.* (2017) elaboraron salsas fermentadas tipo “garum”, utilizando larvas de polilla de cera (*Galleria mellonella*) y saltamontes (*Locusta migratoria*), fermentadas con *koji-kin* (*Aspergillus oryzae*).

Así mismo, elaboraron un producto fermentado marinado a base de larvas de gusano de la harina (*T. molitor*) utilizando un cultivo iniciador comercial para carne Bactoferm F-LC (Chr. Hansen, E.E.U.U.), el cual que consiste en una mezcla de *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus xylosus*. Posteriormente, los mismos autores, fermentaron una pasta de gusano de la harina (*T. molitor*) utilizando 6 distintos cultivos iniciadores, a saber. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. sakei* y *Pediococcus acidilactici* (Borremans *et al.*, 2018).

Por otra parte, Cho *et al.* (2018), elaboraron un condimento líquido fermentado a base de larvas de gusano de la harina (*T. molitor*), mediante el proceso de fermentación de la salsa de soja, utilizando *Aspergillus oryzae* y *Bacillus licheniformis*. Mientras que Zhao *et al.* (2018), elaboraron salsas de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), grillo (*Gryllus bimaculatus*) y gusano de seda (*Bombyx mori*).

Aunque la obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas de insectos, ha sido en gran parte

mediante el uso de enzimas comerciales, algunos estudios han evidenciado la capacidad de diferentes microorganismos, incluyendo BAL, para la obtención de péptidos bioactivos a partir de distintas fuentes proteicas, tales como leche, carne, vegetales e incluso a partir de la proteína de insectos, aunque este último caso ha sido poco estudiado.

En la Cuadro 3, se mencionan algunos estudios donde se han obtenido diversos péptidos bioactivos a partir de la fermentación de diversos insectos.

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han demostrado que cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de productos lácteos regionales, tienen la capacidad de liberar péptidos con actividad antioxidantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) durante la fermentación de leche (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012; Beltrán-Barrientos *et al.*, 2018), sin embargo, no se ha explorado la capacidad de éstas cepas para fermentar proteína de insectos y liberar péptidos con actividad antioxidante y/o inhibidores de la ECA.

Cuadro 3. Bioactividades evaluadas de péptidos bioactivos obtenidos mediante la fermentación de insectos.

<b>Insecto</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Bioactividad evaluada</b>	<b>Referencia</b>
<b>Gusano de seda (<i>Bombyx mori</i> L.)</b>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Lactobacillus hilgardii</i>	antioxidante, fibrinolítica	Cha <i>et al.</i> , 2009
<b>Gusano de seda (<i>Bombyx mori</i> L.)</b>	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Aspergillus kawachii</i>	actividad antioxidante y fibrinolítica	Cha <i>et al.</i> , 2011
	<i>Bacillus subtilis</i> KACC 91157	actividad antioxidante, fibrinolítica, y antiproliferativa	Kim <i>et al.</i> 2017a
		efecto hepatoprotector	Kim <i>et al.</i> 2017b
<b>larvas de escarabajo <i>Protaetia brevitarsis seulensis</i></b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> JBMI F3, <i>L. plantarum</i> JBMI F5, <i>Lactobacillus gasseri</i> Ba9, <i>Aspergillus kawachii</i> KCCM 32819, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KACC 9302 y <i>Bacillus subtilis</i> KACC 91157	actividad antioxidante y actividad fibrinolítica	So-Yeon <i>et al.</i> 2018
	<i>Bacillus subtilis</i> KACC 91157	actividad antioxidante y actividad fibrinolítica	So-Yeon <i>et al.</i> 2019

### 3. HIPÓTESIS

Extractos obtenidos de la fermentación de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) con cepas específicas de *Lactococcus lactis* presentan actividad antioxidante e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de los extractos < 3kDa obtenidos de la fermentación de harina de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*), empleando cepas específicas de *Lactococcus lactis*.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de fermentación de harina de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) por las cepas de estudio.
2. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos < 3kDa obtenidos a partir de la fermentación de harina de gusano de la harina y chapulín.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de la ECA de los extractos < 3kDa obtenidos a partir de la fermentación de harina de gusano de la harina y chapulín

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Medios de Cultivo y Reactivos

Los materiales que se utilizaron en la presente investigación fueron: caldo M17, Peptona (DIFCO, Detroit, MI, EE.UU.), el kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories, INC, Hércules, CA, EE.UU.). Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), acetato de etilo, Hippuril-L-Histidil-L-Leucina, ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Pulmón de conejo, EC. 3.4.15.1, 5 unidades), fosfato de sodio ( $\text{NaHPO}_4$ ), fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), albúmina sérica bovina (BSA), radical catión ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), fluoresceína, 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorado (AAPH), 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), ácido tricloroacético (TCA), carbonato de calcio y reactivo de Folin-Ciocalteu, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Mientras que Fluoraldehyde™ o-Phthaldialdehyde (OPA) de Thermo Fisher (Ciudad de México, México.), la membrana de 3 kDa (0.22  $\mu\text{m}$ , Ultracel Amicon Ultrafiltration Discs) de Millipore, (Billerica, MA, EE.UU.) y el TPTZ (2,4,6-tripiridil-s- triazina) se adquirió de Fluka (parte de Sigma Aldrich Co. LLC, Gillingham, Reino Unido).

### 5.2. Cultivos Bacterianos de Trabajo

Las cepas de trabajo fueron *Lactococcus lactis* NRRLB-50571 y NRRLB-50572, las cuales fueron previamente aisladas de requesón y queso Chihuahua, respectivamente (Gutiérrez-Méndez, *et al.*, 2008). Estas cepas forman parte de la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Animal, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

### 5.3. Preparación de las Muestras de Harina de Gusano de la Harina y Chapulín

La harina de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) fue obtenida de la empresa OptiProt® (Cuernavaca, Morelos, México), mientras que las muestras de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) fueron obtenidas de un mercado tradicional en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca. En el caso específico de las muestras de chapulín, se realizó un proceso de lavado durante 30 min y agitación constante, utilizando agua purificada, y haciendo recambio de agua a los 15 minutos, posteriormente, se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez obtenida la muestra seca, se molieron (molino de café Hamilton Beach, EE.UU.) y ambas (gusano de la harina y chapulín) fueron desgrasadas utilizando el método de Soxhlet (Ribeiro *et al.*, 2019).

### 5.4. Preparación de las Muestras a Inocular

Las muestras de harina (gusano de la harina y chapulín) se disolvieron al 0.5 % en PBS pH 7.0  $\pm$ 0.02 (usando la mitad de PSB para completar con el caldo M17), y se homogenizaron utilizando un agitador mecánico (VWR® Analog Vortex Mixer™, West Chester, PA, EE.UU.) a 1500 rpm (velocidad 5) durante 30 s. Posteriormente se sometieron a un tratamiento térmico (110 °C, 10 min) y a un tratamiento de sonicación (30 min, 50°C) empleando un procesador ultrasónico (VWR Aquasonic™ 50D, Ultrasonic Cleaner, San José, CA, EE.UU.) con un ajuste de 9 (50Hz), por otra parte, el caldo M17 se preparó (concentrado a la mitad) y se esterilizó por separado (121 °C, 15 min), finalmente se mezclaron en condiciones de esterilidad y se adicionó 5% de lactosa estéril.

### 5.5. Caracterización Físicoquímica

La caracterización físicoquímica de las muestras de harina se llevó a cabo siguiendo los

lineamientos de la AOAC (2000). Las pruebas realizadas fueron humedad, grasa, cenizas, fibra cruda y proteína. Cada determinación se realizó por triplicado.

### **5.5.1. Humedad**

La humedad de las muestras se determinó mediante la pérdida de peso por calentamiento en estufa. La pérdida de peso se expresó como porcentaje. Se pesó un gramo de muestra en un crisol ajustado previamente a un peso constante. Los crisoles con muestra fueron colocados en una estufa (VWR Sheldon 1350 GM, EE.UU.) a una temperatura de  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h, posteriormente, los crisoles con la muestra seca se colocaron en un desecador por 20 min, y se registró el peso, nuevamente, los crisoles se colocaron 30 min en la estufa y 20 min en el desecador. Este procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante de las muestras. Los cálculos para determinar el contenido de humedad a partir de la pérdida de peso de la muestra se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M1 - M2)}{M} * 100$$

Donde:

M1 = peso del crisol más muestra húmeda.

M2 = peso del crisol más muestra seca.

M = peso de la muestra.

Las muestras secas se utilizaron para determinar el contenido de grasa.

### **5.5.2. Grasa**

La determinación de grasa cruda se realizó por el método Soxhlet. Se pesó 1.5 g de muestra en un

papel filtro colocado dentro de un cartucho de extracción, ambos previamente pesados. El cartucho, con la muestra, se colocó en el tubo de extracción. Se utilizó un matraz con 50 mL de éter de petróleo, y se realizó el proceso de extracción durante 6 h. Una vez finalizada la extracción se eliminó el solvente por evaporación (Centrivap concentrator LABCONCO, EE.UU.), posteriormente, el matraz con la muestra de grasa se llevó a secado en una estufa (VWR Sheldon 1350 GM, EE.UU.) a  $100 \pm 2$  °C por 10 min, se enfrió en desecador y se registró el peso (Sartorius AG Goettingen, EE.UU.). El porcentaje de grasa se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de grasa cruda} = \left( \frac{M1 - M2}{M} \right) * 100$$

Donde:

M= peso de la muestra

M1= peso del matraz sin muestra

M2= peso matraz con grasa

### 5.5.3. Fibra Cruda

La fibra cruda en la muestra se determinó mediante el método libre de asbesto.

Se pesó 1 g de muestra seca desgrasada y se colocó dentro de un matraz bola de 250 mL, y se le adicionaron 50 mL de una solución de ácido sulfúrico al 1.25 %. El matraz se colocó en una parrilla de calentamiento (Corning hot plate Scholar PC-170, EE.UU.) a 80°C y se conectó a un sistema de refrigeración durante 30 min para su digestión. El matraz se agitó periódicamente para evitar que los sólidos se adhirieran a las paredes. La muestra digerida se filtró (embudo buchner) y se realizaron dos lavados (25 mL de agua hirviendo) en el matraz que contenía la muestra y se volvió a filtrar. Después, se colocó nuevamente la muestra en el matraz y se adicionaron 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 1.25% y se colocó en una parrilla de calentamiento (80°C) y se conectó al sistema de refrigeración por 30 min. Posteriormente, las muestras se filtraron y se realizaron tres lavados consecutivos. El primer lavado fue con 10 mL de ácido sulfúrico al 1.25%, el segundo con

10 mL de agua caliente (50 °C) y el tercero con 10 mL de etanol. La muestra lavada se transfirió a un crisol a peso constante, se secó por 2 h a  $100 \pm 2$  °C, se enfrió en un desecador durante 20 min y se pesó. Posteriormente, se carbonizó el contenido del crisol en el mechero y se calcinó durante 30 min a 500 °C en una mufla (Thermolyne Thermo Scientific, EE.UU.). Finalmente se enfrió en desecador por 20 min y se registró el peso.

El porcentaje de fibra se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fibra cruda} = \left( \frac{M1 - M2}{M} \right) * 100$$

Donde:

M= peso de la muestra

M1= peso de la muestra seca

M2= peso de las cenizas

#### 5.5.4. Cenizas

La determinación del contenido de cenizas en la muestra se determinó mediante el método de calcinación directa.

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un crisol a peso constante. La muestra se calcinó lentamente en el mechero hasta que dejó de desprender humo. Después, el crisol con la muestra calcinada se colocó en una mufla, a una temperatura de 500 °C por 1 h, hasta que las cenizas estuvieron blancas o grises. Posteriormente, los crisoles se colocaron en el desecador durante 20 min y se pesaron. La fórmula para determinar el porcentaje de cenizas fue la siguiente:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(W1 - W2)}{W} * 100$$

Donde:

W1 = Peso del crisol más muestra calcinada.

W2 = Peso del crisol solo.

W=Peso de la muestra.

### 5.5.5. Proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método Micro-Kjeldahl.

Se pesó 0.1 g de muestra desgrasada y se depositó dentro de un matraz de digestión. Se agregaron 1.5 g de mezcla catalizadora (la cual fue preparada con 5g de  $\text{CuSO}_4$  y 93g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado en el matraz que contenía la muestra. Los matraces fueron colocados en el digestor micro-Kjeldahl (Rapid distillation unit LABCONCO, EE.UU.). La muestra se digirió hasta que quedó totalmente clara. Después se dejó enfriar y se adicionaron 10 mL de agua destilada para disolverla. La muestra digerida fue colocada en un destilador micro-Kjeldahl y se neutralizó con aproximadamente 20 mL de NaOH al 40 %, hasta que se tornó de color café. En la plataforma de recepción del destilador, se colocó un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 15 mL de ácido bórico al 4% y 3 gotas de indicador (0.125g de rojo de metilo y 0.0825 de azul de metileno en 100 mL de etanol). Las muestras se titularon con HCl 0.1 N.

Los cálculos fueron los siguientes:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V * N * 0.014 * 100}{M}$$

Donde:

V= ml de HCl 0.1N gastados en la titulación

N= normalidad de la solución de HCl

M= g de la muestra

Para el cálculo del porcentaje de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de nitrógeno} * \text{FC}$$

Factor de conversión (Janssen *et al.*, 2017):

FC= 4.76 para gusano de la harina

FC = 4.5 para chapulín

#### 5.6. Propagación, Selección de Condiciones para la Pre-adaptación de las Cepas a la Proteína de Gusano de la Harina y Chapulín

Las cepas de trabajo fueron propagadas (1% v/v) mediante 3 sub-cultivos (30 °C) en caldo M17 adicionado con dextrosa (5% v/v). Durante el primer sub-cultivo *L. lactis* NRRLB-50571 fue incubado 18 h, mientras que *Lactococcus lactis* NRRLB-50572 se incubó 12 h. Los siguientes sub-cultivos fueron de 6 y 4 h para ambas.

A partir del último sub-cultivo, se tomó una alícuota (1%) y se inóculo en medio M17 con dos concentraciones diferentes de dextrosa (3.5 y 5%) y tres de harina de gusano de la harina y chapulín (0.1, 0.5 y 1%) (Cuadro 4). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 12 h con agitación constante (500 rpm) utilizando un agitador orbital con temperatura controlada (500 rpm, Shaker, Labline Instruments 3540 Orbit, EE.UU.)

Cuadro 4. Porcentaje de harina y dextrosa usados para los tratamientos (A-F) de selección de las condiciones de fermentación

Tratamiento (T)	% harina	% dextrosa
A	0.1	3.5
B	0.5	

<b>C</b>	1	
<b>D</b>	0.1	
<b>E</b>	0.5	5
<b>F</b>	1	

Cada hora se tomó una muestra (200  $\mu$ L) y se registró la densidad óptica ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) en un espectrómetro multimodal (SpectraMax M3, Molecular Devices, C.A.). Con los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos (fase de latencia, tiempo de generación y velocidad máxima de crecimiento) ajustando las curvas de crecimiento con el modelo de Gompertz. Tomando en consideración los parámetros cinéticos calculados, se seleccionaron los niveles de harina y dextrosa que se utilizaron para el ensayo de fermentación.

Una vez seleccionada los niveles de harina y dextrosa, y previo a los ensayos de fermentación, las bacterias fueron pre-adaptadas a la presencia de los dos tipos de proteína (gusano de la harina / chapulín). Para ello, las muestras de harina (gusano de la harina y chapulín) se disolvieron al 0.5 % en agua estéril (usando la mitad de agua para completar con el caldo M17), y se homogenizaron utilizando un agitador mecánico (VWR<sup>®</sup> Analog Vortex Mixer<sup>™</sup>, West Chester, PA, EE.UU.) a 1500 rpm (velocidad 5) durante 30 s. Posteriormente se sometieron a un tratamiento térmico (110 °C, 10 min) y a un tratamiento de sonicación (30 min, 50°C) empleando un procesador ultrasónico (VWR Aquasonic<sup>™</sup> 50D, Ultrasonic Cleaner, San José, CA, EE.UU.) con un ajuste de 9 (50Hz), por otra parte, el caldo M17 se preparó (concentrado a la mitad) y se esterilizó por separado (121 °C, 15 min), finalmente se mezclaron en condiciones de esterilidad y se adicionó 3.5% de dextrosa estéril.

Y a partir del último sub-cultivo en caldo M17 (4 h), se tomó una alícuota al 1% y se inoculó en medio M17 estéril adicionado con dextrosa y cada una de las harinas de estudio, y se incubaron a 30 °C con agitación constante durante 5 h, y se realizaron dos sub-cultivos consecutivos bajo las mismas condiciones, con el objetivo de reducir la fase de latencia, así mismo, a las 5h es el tiempo en el cual las bacterias se encuentran a mitad de su fase exponencial de crecimiento. Finalmente, la concentración celular se determinó en placas de agar M17 utilizando la técnica de vertido en placa y el resultado se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

## 5.7. Condiciones de Fermentación

Para el proceso de fermentación, las muestras desgrasadas de gusano de la harina y chapulín, se disolvieron en una solución amortiguadora de fosfato (pH  $7.0 \pm 0.2$ ) al 0.5% (p/v) y se aplicó un tratamiento térmico (110 °C, 10 min), con el objetivo de eliminar microorganismos propios de la muestra, adicionalmente se aplicó un tratamiento de sonicación (30 min/50 °C) (Mintah *et al.*, 2019) y se evaluó la concentración de proteína por el método de Lowry (descrito en la siguiente sección), antes y después del tratamiento. Posteriormente, se adicionó 3.5% de dextrosa estéril, y a partir del último sub-cultivo (tercer sub-cultivo) del proceso de pre-adaptación, se tomó una alícuota al 3%. Las mezclas se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 30 °C, con agitación constante (500 rpm). Durante la fermentación se monitoreó la disminución del pH. Al final del respectivo periodo de fermentación, las muestras se centrifugaron (3600 x g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante (extracto crudo) se recolectó y almacenó a -20° C hasta su posterior análisis.

Para evaluar la capacidad antioxidante e inhibición de la ECA de las muestras fermentadas, se obtuvieron fracciones <3kDa, utilizando una membrana de corte de 3 kDa (0.22  $\mu\text{m}$ , Ultracel Amicon Ultrafiltration Discs).

## 5.8. Cuantificación de Proteína

La concentración de proteína de las muestras (extracto crudo y fracciones <3 kDa) se cuantificó por el método modificado de Lowry. Para ello, se siguió las instrucciones del manual del kit DC Protein Assay kit (ANEXO 11.2). Brevemente, se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de las muestras en una microplaca de 96 pocillos (Corning™, Costar®, Tewksbury, MA, EUA), más 25  $\mu\text{L}$  de reactivo A y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo B. Las mezclas fueron incubadas durante 15 min en oscuridad y posteriormente se registró la lectura en un espectrofotómetro (SpectraMax M3) a una absorbancia de 750nm.

La concentración peptídica se determinó empleando una curva estándar de 5 puntos (ANEXO 11.1) (0.0125 a 1.5 mg/mL) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como patrón.

## 5.9. Determinación del Grado de Hidrólisis Mediante el Método de Ortoftaldialdehído

Los grupos  $\alpha$ -amino libres (h) se cuantificaron por espectrofotometría utilizando el reactivo Fluoraldehyde™ o-Phthaldialdehyde (OPA, Nilse *et al.*, 2001).

Para realizar la determinación, se tomaron 500  $\mu$ L de los extractos crudos obtenidos de la fermentación. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ L de TCA al 24% (v/v), la mezcla se dejó reposar 10 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes se recolectaron por centrifugó (3600 x g, 40 min), y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis (Hall *et al.*, 2018).

Para la cuantificación de los grupos  $\alpha$ -amino libres se mezclaron 20  $\mu$ L de los sobrenadantes previamente colectados, en una microplaca de 96 pozos (Corning™), con 200  $\mu$ L del reactivo OPA. La mezcla se dejó reposar durante 2 min y se registró la fluorescencia a una longitud de excitación de 340 nm y 436 de emisión (SpectroMax M3). El ensayo se realizó en condiciones de oscuridad. El grado de hidrólisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%H = \left( \frac{h}{htot} \right) * 100$$

Donde  $h_{tot}$  es la hidrólisis total de la proteína presente en las muestras de harina con HCl (6M, 150 °C, 6h) (Vázquez *et al.*, 1994). La concentración de  $\alpha$ - amino liberados se cuantificó en relación a una curva estándar de L-leucina (15 a 250  $\mu$ g/mL) (ANEXO 11.1).

## 5.10. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó en los extractos <3kDa ( $E < 3$ ) y se realizó por cuatro métodos: TEAC, ORAC, DPPH y FRAP. Además, se cuantificó el contenido de polifenoles. Todos los ensayos se realizaron en una placa de 96 pozos y las determinaciones se realizaron en un

espectrofotómetro (SpectraMax M3).

### **5.10.1. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método TEAC**

El radical ABTS se preparó con la mezcla de ABTS (7mM) y persulfato de potasio (2.45 mM). Para ello se pesaron 0.096 g de ABTS y 0.0166 g de persulfato de potasio y se disolvieron por separado en 5 mL de agua milli-Q. Posteriormente, las dos soluciones se mezclaron y se aforó a 25 mL dejándose incubar a 30 °C durante 16 h en condiciones de oscuridad. Posteriormente, la solución del radical ABTS se diluyó con PBS hasta obtener una  $DO_{734\text{ nm}} = 0.7 \pm 0.02$ . Finalmente, 5  $\mu\text{L}$  de los extractos (E<3) se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  de radical ABTS ajustado y se incubó por 7 min a 30 °C y se registró la absorbancia (Re *et al.* 1999; Zulueta et al., 2009).

Se preparó una solución de Trolox (en metanol al 80%), la cual se utilizó para preparar una curva estándar (0-500  $\mu\text{M}$ ) (ANEXO 11.1). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox.

### **5.10.2. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método ORAC**

La capacidad antioxidante por este método se determinó siguiendo la metodología establecida por Zulueta *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de extractos (E<3) con 40  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (78 mM), y se añadieron rápidamente 40  $\mu\text{L}$  de radical AAPH (221 mM) con una micropipeta multicanal (Sartorius™ Biohit™ Proline™ Plus Multichannel Mechanical Pipetter, EE.UU.). Inmediatamente se dejó incubar durante 3 h a 37 °C y registró la fluorescencia ( $Exc_{485\text{ nm}}$ ,  $Em_{535\text{ nm}}$ ) cada 5 min, con agitación de 10 s antes de cada lectura.

Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a la curva del blanco (PBS), realizando la multiplicación de los datos originales por el factor fluorescencia blanco,  $t=0$  /fluorescencia muestra=0 (Dávalos *et al.*, 2004; Zulueta *et al.*, 2009). Posteriormente, los datos normalizados de fluoresceína se graficaron con respecto al tiempo, con el fin de obtener las áreas bajo la curva de decaimiento de fluoresceína:

$$1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0$$

Los valores de ORAC se refieren al área de protección neta de la fluoresceína, donde  $f_0$  = fluorescencia en tiempo 0,  $f_i$  = fluorescencia de cada uno de los tiempos evaluados. Las ecuaciones de regresión entre las áreas y la concentración de Trolox fueron calculados para todas las muestras. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  de Trolox, utilizando una curva de calibración de 0-500  $\mu\text{M}$  (ANEXO 11.1).

### **5.10.3. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método DPPH**

El ensayo se realizó siguiendo la metodología reportada por Herald et al. (2012). El radical DPPH (150 Mm) se preparó en una solución de metanol (80%), con agitación constante (1500 rpm, 2 min). Posteriormente, 25  $\mu\text{L}$  de extractos ( $E < 3$ ) fueron agregados en una micro placa y se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH. Las muestras se dejaron incubar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se registró la absorbancia a 517 nm.

Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  de Trolox, utilizando una curva de calibración de 0-500  $\mu\text{M}$  (ANEXO 11.1).

### **5.10.4. Determinación de la Actividad Antioxidante por el Método FRAP**

El ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) con las siguientes modificaciones. La solución FRAP se preparó mezclando 10 mL de solución amortiguadora de acetato (300 mM, ajustado a pH 3.6 con ácido acético) con 1 mL de TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) y 1 mL de cloruro férrico ( $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 20 mM), la mezcla se agitó y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, 25  $\mu\text{L}$  de extracto ( $E < 3$ ) se mezclaron con 175  $\mu\text{L}$  de FRAP.

La absorbancia se midió a 595 nm después de 30 min de incubación. Se utilizó un control que no contenía muestra y se midió la absorbancia de fondo agregando solución amortiguadora de acetato. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  de Trolox, utilizando una curva de calibración de 0-500  $\mu\text{M}$  (ANEXO 11.2).

#### **5.10.5. Contenido de Polifenoles Totales**

Los compuestos polifenólicos totales fueron determinados por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1995), con las siguientes modificaciones: se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de extracto (E<3) con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N y se incubaron por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (7.5% v/v). La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue registrada a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg /mL de ácido gálico, utilizando una curva de calibración de 0-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ANEXO 11.1).

#### **5.11. Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina**

Para evaluar el porcentaje de inhibición de la ECA se seleccionaron los extractos <3kDa que mostraron mayor actividad antioxidante y el ensayo realizó de acuerdo a la metodología descrita por Wú et al., (2002), el cual consistió en mezclar el sustrato Hipuril-Histidil-Leucina (HHL, 2.17 mM), con una solución amortiguadora de boratos (100 mM conteniendo 300 mM de NaCl, pH 8.3), la enzima ECA (2mU/mL) y el inhibidor (E<3) en diferentes concentraciones (Cuadro 5), en un volumen final de 70  $\mu\text{L}$ .

El sustrato HHL, mezclado con la muestra (E<3), así como la ECA, se incubaron a 37°C durante 10 min. Posteriormente, las dos soluciones se combinaron e incubaron en un Eppendorf-Theromixer R Mixer (Brinkmann Instruments, New York, EE.UU.) con agitación constante a 450 rpm durante 30 min a 37 °C, pasado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con la adición de 85  $\mu\text{L}$  de HCl 1M.

Cuadro 5. Mezcla de reacciones para ensayo de inhibición de actividad de ECA

Reacción	Sustrato (μL)	Solución amortiguadora (μL)	ECA (μL)	Muestra (μL)	Total (μL)
Sustrato	50	20	-	-	70
Sustrato + enzima	50	10	10	-	70
Muestra	50	-	10	10	70

El análisis de los productos de reacción, ácido hipúrico (AH) y HHL, se realizó por cromatografía líquida (HPLC), para lo cual se utilizó un sistema HPLC Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Alemania) con columna ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> (4.6 x 100 nm, 3.5 μm), con detección a 228 nm (arreglo de diodos DAD). La fase móvil consistió de un solvente A: agua DI (desionizada), y un solvente B: acetonitrilo, ambos con 0.05% de ácido trifluoroacético, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min (20μL con inyección automática). El programa de elución fue: un gradiente de acetonitrilo (solvente B) de 5 a 60% durante 10 min, dos min con el solvente B a 60% y posteriormente una reducción en gradiente de 60% a 5% B en un minuto y manteniendo a 5% B por 4 min. El % de inhibición de la actividad de la ECA se definió como:

$$\text{Inhibición de ECA (\%)} = \left( \frac{A-B}{A} \right) * 100$$

Donde A: corresponde al área del ácido hipúrico (AH) resultante de la reacción del sustrato (HHL) y la enzima (ECA). B: área del ácido hipúrico (AH) resultante de la reacción del sustrato (HHL) y la enzima (ECA) en presencia del inhibidor. Los datos fueron procesados en el software ChemStation Agilent 11.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95% de confianza para evaluar las bioactividades, mientras que para la selección de las condiciones de fermentación se realizó un DCA con arreglo factorial 2x2, (donde el factor % dextrosa tiene 2 niveles y el factor % harina 3 niveles, teniendo un total de 6 tratamientos A-F).

Así mismo se realizó una t-pareada para evaluar el efecto de la sonicación después del tratamiento térmico, donde la variable de respuesta fue el contenido de proteína.

En caso de existir diferencias significativas en variables evaluadas entre las cepas y los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey-Kramer, considerando significativo cuando  $P < 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS, 2019 (Kaysville, UT, EUA). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización de las Muestras Gusano de la Harina y Chapulín

El contenido de proteína, grasa, fibra, cenizas y humedad para el gusano de la harina fueron de 53, 33, 7, 4.6 y 1.8%, respectivamente; mientras que para chapulín fueron de 60, 17.5, 8.3 y 9.8 y 3.9% respectivamente.

Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos. Por ejemplo, Bednárová (2013) reportó 50.7% de proteína para gusano de la harina, mientras que Rumpold y Schlüter (2013) reportan 61.32% para grillos. Ramos-Elourdy et al. (1997), reportaron porcentajes de 56 al 80% de proteína para especies del orden orthoptera (*Sphenarium*). Por otra parte, en lo que respecta a las muestras de gusano de la harina, no se observó diferencias en lo reportado en la etiqueta del producto comercial, para los parámetros evaluados.

El porcentaje de grasa fue mayor para el gusano de la harina, mientras que la proteína fue menor, respecto a las muestras de chapulín. Este efecto podría atribuirse a que las especies que tienen un mayor contenido proteico tienen un menor contenido energético, por lo que las larvas son generalmente más ricas en energía en comparación con los insectos en etapa adulta, debido a su alto contenido de grasa (Bednárová, 2013; Kouřimská y Adámková, 2016). Nuestros resultados son similares a lo reportado por Bednárová (2013) quien reportó 36% de grasa para gusano de la harina. Por otra parte, Rumpold y Schlüter (2013) reportaron 13.4% para grillos, mientras que Ramos-Elourdy et al. (1997) reportaron porcentajes de 4 al 12% para especies del orden orthoptera (*Sphenarium*).

En relación al contenido de fibra y cenizas, la harina de chapulín presentó porcentajes superiores ( $p < 0.05$ ) respecto a la harina del gusano de la harina, lo cual podría deberse a un mayor contenido de quitina en las muestras de chapulines. Estos resultados son similares a los reportados por Rumpold y Schlüter (2013) quienes reportaron porcentajes de 9.5% y 6.2 % en fibra y cenizas. mientras que Bednárová (2013), reportó un porcentaje de 18 % de fibra para gusano de la harina, siendo mayor que en nuestro estudio. El contenido de fibra en insectos comestibles está conformado principalmente por quitina la forma más común de fibra presente en los insectos, ya

que forma parte de su esqueleto, la cual se ha reportado, puede ser una fuente de fibra en nuestro metabolismo, debido a la presencia de quitinasas en jugos gástricos humanos (Paoletti *et al.*, 2007). Estas diferencias en la composición de los insectos podrían deberse a que existe una gran variabilidad en los componentes nutrimentales, y éstos varían según la especie, etapa metamórfica, hábitat y factores de reproducción como la dieta, la temperatura, el agua y la ubicación (FAO, 2017; Wendin *et al.*, 2019).

Por lo que las diferencias entre los insectos en el presente estudio, pueden ser debido a factores como la etapa metamórfica en la cual se utilizaron, puesto que el grillo se utilizó en la etapa adulta, respecto a la etapa larvaria, en la que se utilizó el gusano de la harina. Por otra parte, los chapulines fueron obtenidos de un mercado local, en donde comúnmente son recolectados del campo, y no hay una estandarización respecto a la alimentación, mientras que las muestras de gusano de la harina, fueron obtenidos de una empresa en la cual se encuentran estandarizados los procesos. Así mismo, dichas diferencias se ven reflejadas por el orden al que pertenecen ambos insectos, puesto que el chapulín pertenece al orden de los ortópteros, mientras que el gusano de la harina a los coleópteros.

## 7.2. Propagación y Pre-adaptación de *Lactococcus lactis* a la Harina de Gusano de la Harina y Chapulín

Los tiempos de reactivación de las cepas fueron para *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 de 18, 6, 4 h y para B-50572 de 12, 6, 4 h, tiempo en el cual las bacterias se encuentran en la fase exponencial, a diferencia de los tiempos reportados anteriormente en el que las bacterias se encuentran en la fase estacionaria tardía (Rodríguez-Figueroa, 2008). Se ha reportado que, durante la fase exponencial las bacterias se encuentran metabólicamente más activas, a diferencia de la fase estacionaria (William *et al.*, 2002), lo que podría contribuir a tener una menor fase de adaptación, ya que al encontrarse en la fase estacionaria se tiene un mayor tiempo en la etapa de latencia, debido a que con frecuencia las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se necesita tiempo para la síntesis de material genético necesario para su duplicación (Madigan *et al.*, 2008).

Para la selección de los niveles de harina y dextrosa que se utilizaron en los ensayos de fermentación se observó el efecto de la interacción en el arreglo factorial ( $P < 0.05$ ) entre el % de harina y % de dextrosa.

El efecto de estas condiciones en los parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50571 con harina de gusano de la harina se presentan en la Cuadro 6. El menor tiempo de fase latencia (lag) y tiempo de generación se obtuvo con el T B (0.5% de harina / 3.5 % dextrosa), indicando que la bacteria necesitó menor tiempo para adaptarse a las condiciones del medio, y menor tiempo para la duplicación de la población. Adicionalmente se observó el mismo comportamiento en la cinética de crecimiento con todos los tratamientos en cuanto al tiempo de latencia, fase exponencial y estacionaria, a diferencia del T C, donde se obtuvo una menor absorbancia a partir de las 7 h, cuando la bacteria se encontró en fase estacionaria (Figura 9).

Este comportamiento fue similar para *L. lactis* NRRL B-50571 con la de harina de chapulín y para *L. lactis* NRRL B-50572 con ambas harinas (gusano de la harina y chapulín), como se muestra a continuación (Cuadro 7, 8 y 9 y Figura 10, 11 y 12).

Cuadro 6. Parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50571 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 y 5% de dextrosa.

<i>L. lactis</i> NRRL B-50571					
gusano de la harina					
T	% harina	% dextrosa	FL (h)	MVC (h)	TG (h)
A	0.1		2.89 ± 0.14 <sub>a</sub>	0.43 ± 0.03 <sub>b</sub>	0.69 ± 0.05 <sub>ab</sub>
B	0.5	3.5	2.38 ± 0.07 <sub>ac</sub>	0.46 ± 0.01 <sub>b</sub>	0.55 ± 0.02 <sub>a</sub>
C	1		2.69 ± 0.13 <sub>a</sub>	0.41 ± 0.01 <sub>ab</sub>	0.71 ± 0.01 <sub>b</sub>
D	0.1		3.02 ± 0.33 <sub>ab</sub>	0.54 ± 0.02 <sub>c</sub>	0.60 ± 0.08 <sub>ab</sub>
E	0.5	5	2.64 ± 0.13 <sub>a</sub>	0.36 ± 0.03 <sub>a</sub>	0.83 ± 0.06 <sub>c</sub>
F	1		2.45 ± 0.13 <sub>a</sub>	0.42 ± 0.03 <sub>bd</sub>	0.70 ± 0.04 <sub>b</sub>

Letras diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos (columnas) respecto a cada parámetro cinético. Los datos representan la media ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

T: código del tratamiento

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

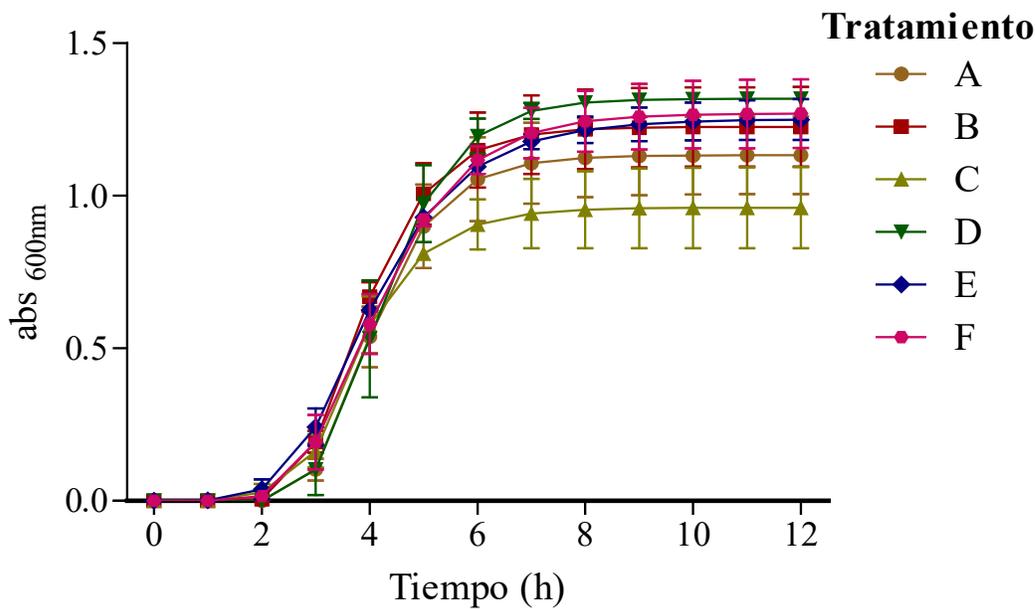


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *L. lactis* NRRL B-50571 con los distintos tratamientos: 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 / 5% de dextrosa.

Cuadro 7. Parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50571 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 / 5% de dextrosa.

<i>L. lactis</i> NRRL B-50571					
Chapulín					
T	% harina	% dextrosa	FL (h)	MVC (h)	TG (h)
A	0.1	3.5	2.89 ± 0.14 <sub>b</sub>	0.44 ± 0.03 <sub>a</sub>	0.69 ± 0.05 <sub>a</sub>
B	0.5		2.27 ± 0.29 <sub>a</sub>	0.46 ± 0.02 <sub>a</sub>	0.65 ± 0.02 <sub>a</sub>
C	1		2.73 ± 0.13 <sub>ab</sub>	0.60 ± 0.05 <sub>b</sub>	0.50 ± 0.04 <sub>b</sub>
D	0.1	5	2.60 ± 0.08 <sub>ab</sub>	0.50 ± 0.02 <sub>ab</sub>	0.60 ± 0.02 <sub>ab</sub>
E	0.5		2.38 ± 0.24 <sub>a</sub>	0.47 ± 0.06 <sub>a</sub>	0.66 ± 0.09 <sub>a</sub>
F	1		2.65 ± 0.14 <sub>ab</sub>	0.45 ± 0.04 <sub>a</sub>	0.67 ± 0.05 <sub>a</sub>

Letras diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre columnas respecto a cada parámetro cinético. Los datos representan la media ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

T: código del tratamiento.

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

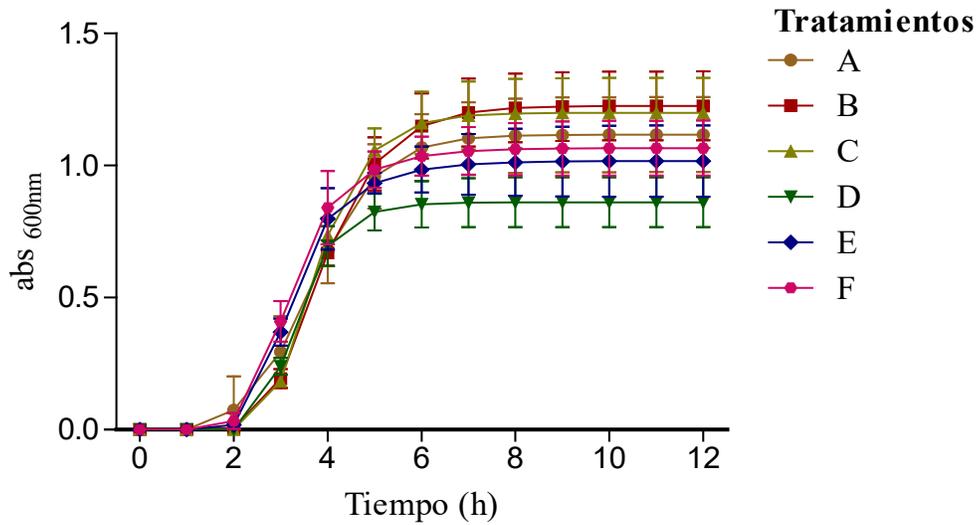


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *L. lactis* NRRL B-50571 adicionado con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 / 5% de dextrosa.

Cuadro 8. Parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 y 5% de dextrosa

<i>L. lactis</i> NRRL B-50572 chapulín					
T	% harina	% dextrosa	F. Lag (h)	MVC (h)	TG (h)
A	0.1		4.32 ± 0.46 <sub>a</sub>	0.49 ± 0.04 <sub>ab</sub>	0.61 ± 0.04 <sub>a</sub>
B	0.5	3.5	3.96 ± 0.56 <sub>a</sub>	0.47 ± 0.04 <sub>a</sub>	0.65 ± 0.06 <sub>a</sub>
C	1		4.56 ± 0.34 <sub>a</sub>	0.46 ± 0.02 <sub>a</sub>	0.65 ± 0.03 <sub>a</sub>
D	0.1		4.56 ± 0.39 <sub>a</sub>	0.60 ± 0.02 <sub>b</sub>	0.50 ± 0.02 <sub>a</sub>
E	0.5	5	4.27 ± 0.23 <sub>a</sub>	0.53 ± 0.08 <sub>ab</sub>	0.56 ± 0.07 <sub>a</sub>
F	1		4.09 ± 0.31 <sub>a</sub>	0.41 ± 0.05 <sub>a</sub>	0.63 ± 0.08 <sub>a</sub>

Letras diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre columnas respecto a cada parámetro cinético. Los datos representan la media ± desviación estándar ( $n = 3$ ).

T: código del tratamiento.

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

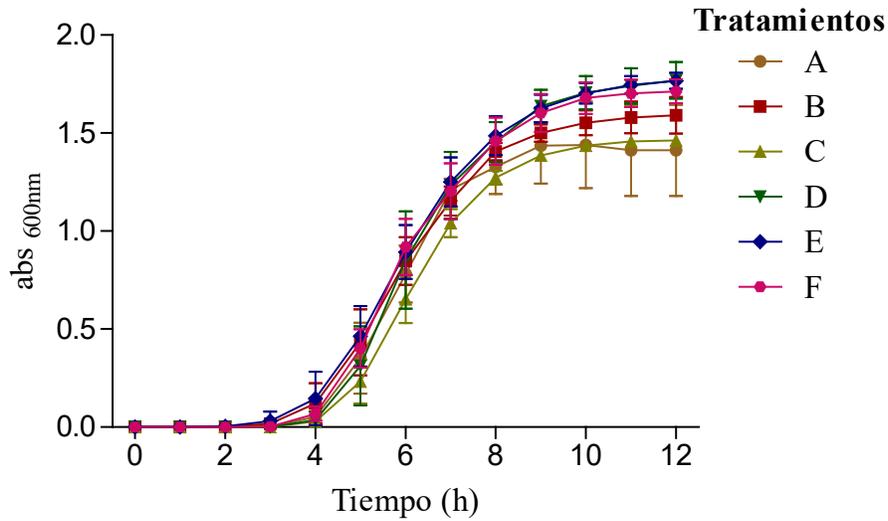


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de *L. lactis* NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de chapulín y 3.5 y 5% de dextrosa.

Cuadro 9. Parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50572 con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 y 5% de dextrosa.

<i>L. lactis</i> NRRL B-50572					
gusano de la harina					
T	% harina	% dextrosa	FL (h)	MVC (h)	TG (h)
A	0.1	3.5	4.63 ± 0.43 <sub>a</sub>	0.46 ± 0.05 <sub>a</sub>	0.66 ± 0.05 <sub>a</sub>
B	0.5		3.43 ± 0.09 <sub>b</sub>	0.42 ± 0.04 <sub>a</sub>	0.72 ± 0.03 <sub>a</sub>
C	1		4.13 ± 0.61 <sub>a</sub>	0.38 ± 0.55 <sub>a</sub>	0.72 ± 0.10 <sub>a</sub>
D	0.1	5	4.27 ± 0.45 <sub>a</sub>	1.35 ± 0.32 <sub>c</sub>	0.41 ± 0.06 <sub>a</sub>
E	0.5		4.16 ± 0.30 <sub>a</sub>	0.79 ± 0.18 <sub>b</sub>	0.39 ± 0.05 <sub>a</sub>
F	1		3.88 ± 0.45 <sub>a</sub>	0.40 ± 0.01 <sub>a</sub>	0.97 ± 0.12 <sub>a</sub>

Letras diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre columnas respecto a cada parámetro cinético. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ).

T: código del tratamiento.

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

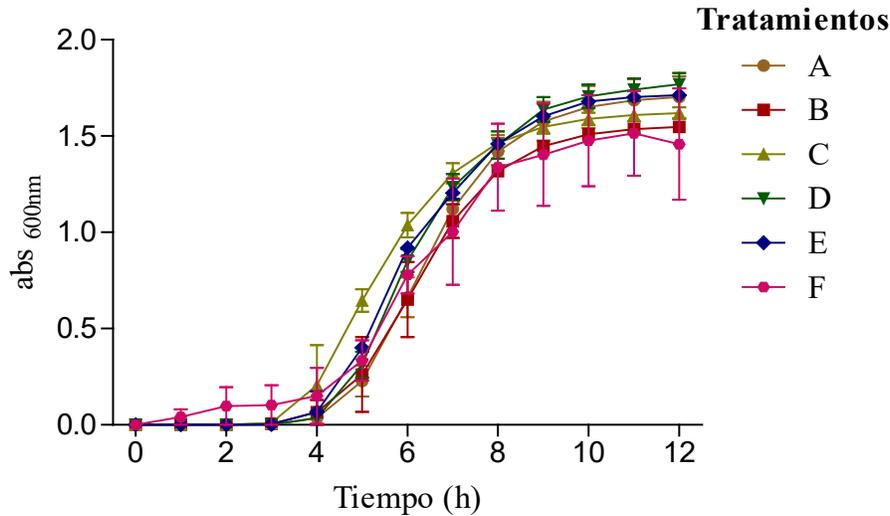


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de *L. lactis* NRRL B-50572 adicionado con 0.1, 0.5 y 1.0 % de harina de gusano de la harina y 3.5 / 5% de dextrosa.

Una vez seleccionado el tratamiento B, se prosiguió a realizar la pre-adaptación de las bacterias a las muestras de harina. En la Cuadro 10 se muestran los parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50571 con harina de gusano de la harina y chapulín, de los sub-cultivos que se realizaron en el medio adicionado con harina. Los resultados mostraron que la fase de adaptación fue menor ( $P < 0.05$ ) al realizar el tercer sub-cultivo, para ambas harinas de insectos, indicando que el metabolismo de la bacteria tarda menos en producir las enzimas necesarias para comenzar a duplicarse en el medio (Madigan *et al.*, 2008), dichos resultados concuerdan por lo reportado por Nielsen *et al.* (2015). Así mismo la máxima velocidad de crecimiento fue en el tercer pase, mientras que el tiempo de generación fue menor en el segundo pase.

Este comportamiento fue similar para *L. lactis* NRRL B-50572 con ambas harinas (chapulín y gusano de la harina) Cuadro 11.

Por otra parte, se observó dicho comportamiento en las cinéticas de crecimiento (Figura 13), donde se puede observar una menor fase de adaptación al realizar un tercer pase para ambas bacterias con las respectivas harinas de insectos, lo cual podría verse reflejado en una mejor fermentación, tal y como lo reporta Nielsen *et al.* 2015, donde observan una mejor fermentación de la xilosa, después de pre adaptar a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en contraparte, observan que, se obtiene un menor rendimiento celular después de la pre-adaptación, dicho comportamiento es similar que en el presente estudio, pues se obtiene una menor fase de adaptación pero se observa una disminución en la absorbancia del tercer pase de pre adaptación.

Cuadro 10. Parámetros cinéticos de las cinéticas de crecimiento de 3 sub-cultivos para la pre-adaptación de *L. lactis* NRRL B-50571 a la harina de gusano de la harina y chapulín

<b><i>L. lactis</i> NRRL B-50571</b>			
<b>Gusano de la harina</b>			
<b>Sub-cultivo</b>	<b>FL (h)</b>	<b>MVC (h)</b>	<b>TG (h)</b>
<b>Primero</b>	2.64 ± 0.09 <sub>a</sub>	0.46 ± 0.03 <sub>a</sub>	0.60 ± 0.04 <sub>a</sub>
<b>Segundo</b>	2.73 ± 0.08 <sub>a</sub>	0.77 ± 0.05 <sub>b</sub>	0.38 ± 0.06 <sub>b</sub>
<b>Tercero</b>	1.00 ± 0.03 <sub>b</sub>	0.29 ± 0.04 <sub>c</sub>	1.01 ± 0.09 <sub>c</sub>
<b>chapulín</b>			
<b>Primero</b>	3.96 ± 0.05 <sub>a</sub>	0.47 ± 0.07 <sub>a</sub>	0.64 ± 0.08 <sub>a</sub>
<b>Segundo</b>	4.89 ± 0.06 <sub>b</sub>	0.57 ± 0.05 <sub>ab</sub>	0.53 ± 0.05 <sub>ab</sub>
<b>Tercero</b>	2.94 ± 0.05 <sub>c</sub>	0.39 ± 0.05 <sub>ac</sub>	0.77 ± 0.07 <sub>ac</sub>

Letras diferentes indican diferencias (P<0.05) entre sub-cultivos (columnas) para cada parámetro cinético.

Los datos representan la media ± desviación estándar (n = 3).

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

Cuadro 11. Parámetros cinéticos de las cinéticas de crecimiento de 3 pases de pre-adaptación de *L. lactis* NRRL B-50572 con proteína de gusano de la harina y chapulín.

<b><i>L. lactis</i> NRRL B-50572</b>			
<b>Gusano de la harina</b>			
	<b>FL (h)</b>	<b>MVC (h)</b>	<b>TG (h)</b>
<b>Primera cinética</b>	4.16 ± 0.07 <sub>a</sub>	0.41 ± 0.06 <sub>a</sub>	0.71 ± 0.08 <sub>a</sub>
<b>Segunda cinética</b>	2.20 ± 0.03 <sub>b</sub>	0.36 ± 0.05 <sub>a</sub>	0.82 ± 0.05 <sub>a</sub>
<b>Tercera cinética</b>	2.03 ± 0.05 <sub>b</sub>	0.38 ± 0.03 <sub>a</sub>	0.79 ± 0.06 <sub>a</sub>
<b>Chapulín</b>			
	<b>FL (h)</b>	<b>MVC (h)</b>	<b>TG (h)</b>
<b>Primera cinética</b>	2.64 ± 0.07 <sub>a</sub>	0.46 ± 0.08 <sub>a</sub>	0.65 ± 0.15 <sub>a</sub>
<b>Segunda cinética</b>	3.13 ± 0.05 <sub>b</sub>	0.69 ± 0.04 <sub>b</sub>	0.43 ± 0.02 <sub>ab</sub>
<b>Tercera cinética</b>	1.54 ± 0.03 <sub>c</sub>	0.36 ± 0.05 <sub>a</sub>	0.84 ± 0.06 <sub>ac</sub>

Letras diferentes indican diferencias (P<0.05) entre columnas respecto a cada parámetro cinético.

Los datos representan la media ± desviación estándar (n = 3).

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

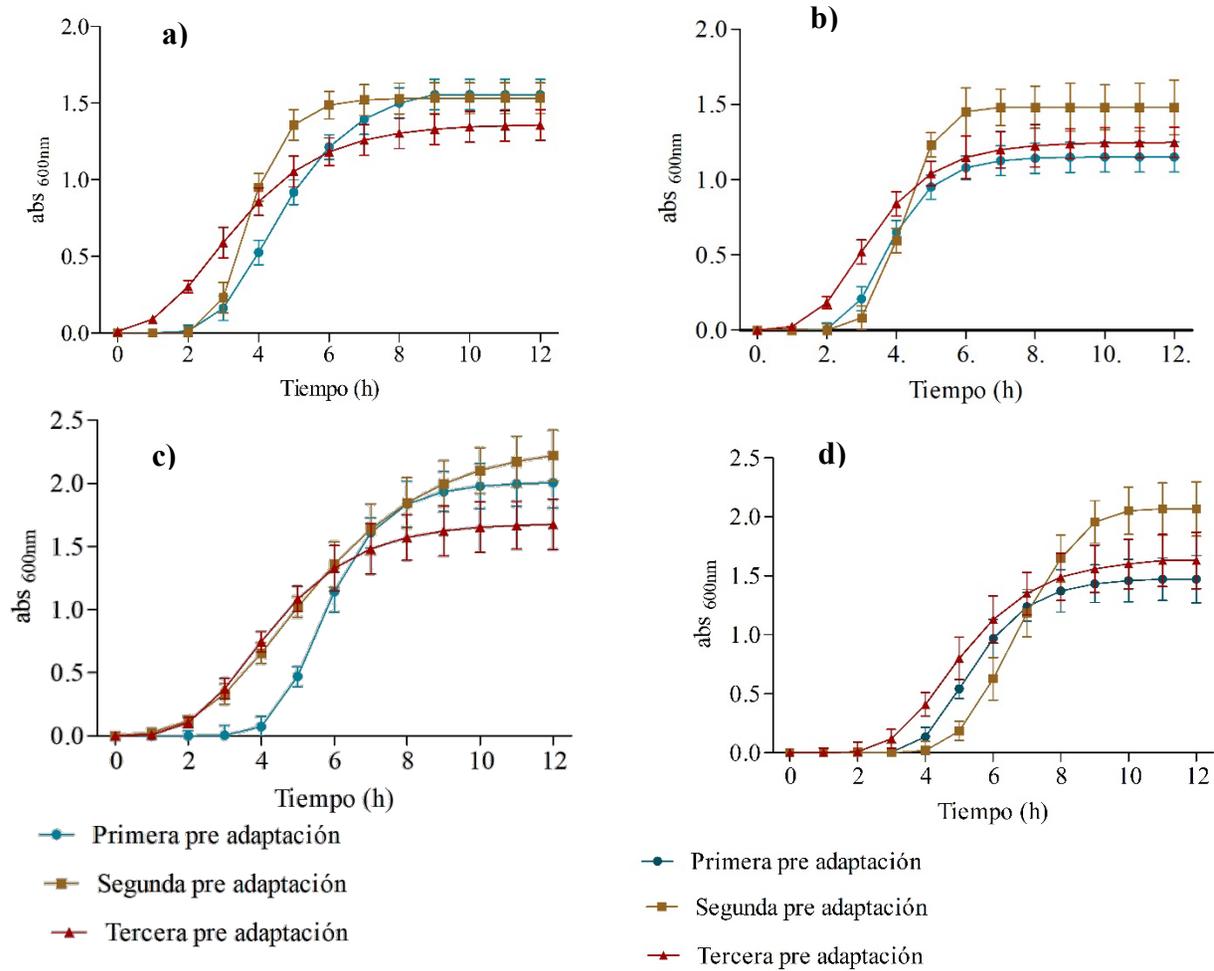


Figura 13. Cinéticas de crecimiento de tres pases de pre adaptación de a) *L. lactis* NRRL B-50571 con harina de gusano de la harina; b) *L. lactis* NRRL B-50571 con harina de chapulín; c) *L. lactis* NRRL B-50572 con harina de gusano de la harina; d) *L. lactis* NRRL B-50572 con harina de chapulín.

Los resultados de concentración celular de las curvas de crecimiento se muestran en la Cuadro 12. La concentración bacteriana a las 5 horas para las tres cinéticas fue de  $10^9$ UFC/mL. Se ha reportado que la producción de péptidos bioactivos depende de la actividad enzimática del sistema proteolítico de la bacteria y éste está influenciado por la fase de crecimiento microbiano, manteniéndose durante la fase exponencial y el periodo inicial de la fase estacionaria, pero disminuyendo durante el progreso de la fase estacionaria, lo que sugiere que la fase exponencial es la etapa donde debe utilizarse la bacteria para iniciar la fermentación (William *et al* 2002). Por lo que al tener una menor fase lag en el tercer cultivo y el mismo conteo celular en los tres a las 5 h cuando la bacteria se encuentra en fase exponencial, se puede considerar que hacer un tercer pase para la pre-adaptación de la bacteria contribuiría a que las bacterias puedan crecer mejor al utilizarse para la fermentación.

Cuadro 12. Concentración celular de los tres sub-cultivos de *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572 después de 5 h de incubación (30 °C) en medio M17 adicionado con 0.5% de harina de gusano de la harina/chapulín y 3.5 % dextrosa en las tres curvas de pre-adaptación.

Sub-cultivo	<i>L. lactis</i> NRRL B-50572		<i>L. lactis</i> NRRL B-50571	
	gusano de la harina	chapulín	gusano de la harina	chapulín
	UFC/mL		UFC/mL	
<b>Primero</b>	$1.5 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$
<b>Segundo</b>	$2.6 \times 10^9$	$2.2 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$2.8 \times 10^9$
<b>Tercero</b>	$2.9 \times 10^9$	$2.5 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$

### 7.3. Condiciones de Fermentación

Los resultados de proteína amínica en el extracto crudo de chapulín y gusano de la harina antes y después del tratamiento de sonicación se muestra en la Figura 14. La concentración de proteína incrementó ( $P < 0.05$ ) para ambas muestras, siendo mayor el aumento en las muestras de gusano de la harina, lo cual podría deberse a un menor contenido de quitina en dicha muestra. Estos resultados podrían deberse a la liberación de proteína que se encontraba unida a quitina debido a la fuerza de corte y cavitación causadas por ondas sonoras de alta presión (Chandrapala *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

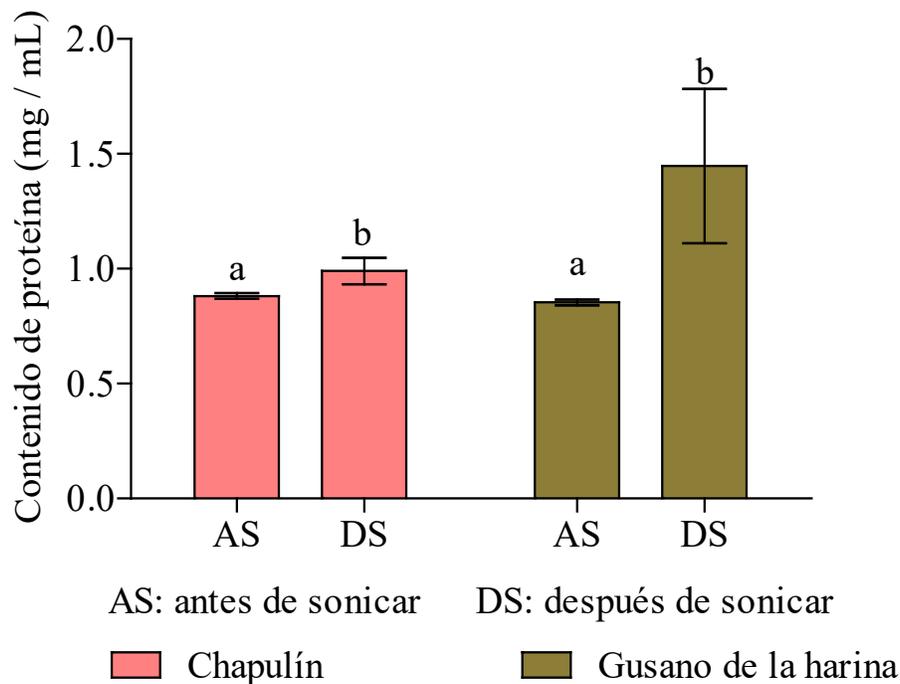


Figura 14. Contenido de proteína amínica, expresada en mg/mL, en el extracto crudo de chapulín y tenebrio antes y después de sonicación. Letras diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos para cada muestra de harina.

### 7.3.1. Disminución de pH

La disminución de pH se muestra en la Figura 15. El pH se considera uno de los parámetros más importantes de la fermentación, ya que puede afectar la vía metabólica de las bacterias (Kim *et al.*, 2011), en conjunto con la acidez (Van *et al.*, 2007). Por otra parte, los productos representativos obtenidos de la fermentación, son compuestos orgánicos que se han reducido más que otros, como el ácido láctico y péptidos (Jay *et al.*, 2005). Una vez iniciada la fermentación, el pH disminuirá a medida que avance la fermentación (Kim *et al.*, 2011), por lo que, con el resultado de la disminución del pH a las 24 h, se puede concluir que se llevó a cabo la fermentación.

El pH inicial de las muestras fue de  $7.0 \pm 0.02$ , y ambas muestras disminuyeron el pH a 4 después de 24 h de incubación, para ambas harinas. Éstos valores son similares a los reportados por Mouritsen *et al.* (2017), en donde elaboraron salsas de gusano de la harina inoculadas con *Aspergillus oryzae* encontrando valores de 4.5 – 5.5 después de diez semanas. Mientras que salsas

de gusano de la harina después de dos semanas de fermentación con *Aspergillus oryzae* y *Bacillus licheniformis*, no mostraron cambio significativo en el pH, pero sí un aumento en la acidez titulable (Cho *et al.* 2018). Así mismo, So-Yeon *et al.* (2019), fermentaron larvas de *Protaetia brevitarsis seulensis* utilizando *Bacillus subtilis* KACC 91157 durante 10 días, y el pH disminuyó de 6.44 a 4.0.

Por otra parte, las cepas en estudio se han utilizado para fermentar leche, Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010), reportó que *L. lactis* NRRL B-50571 y 50572 disminuyen el pH a 4 después de 24 h de fermentación de la leche; estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio con las muestras de insectos, lo que sugiere que las bacterias tienen la capacidad de fermentar una matriz diferente a la de la leche, en este caso de los insectos en estudio.

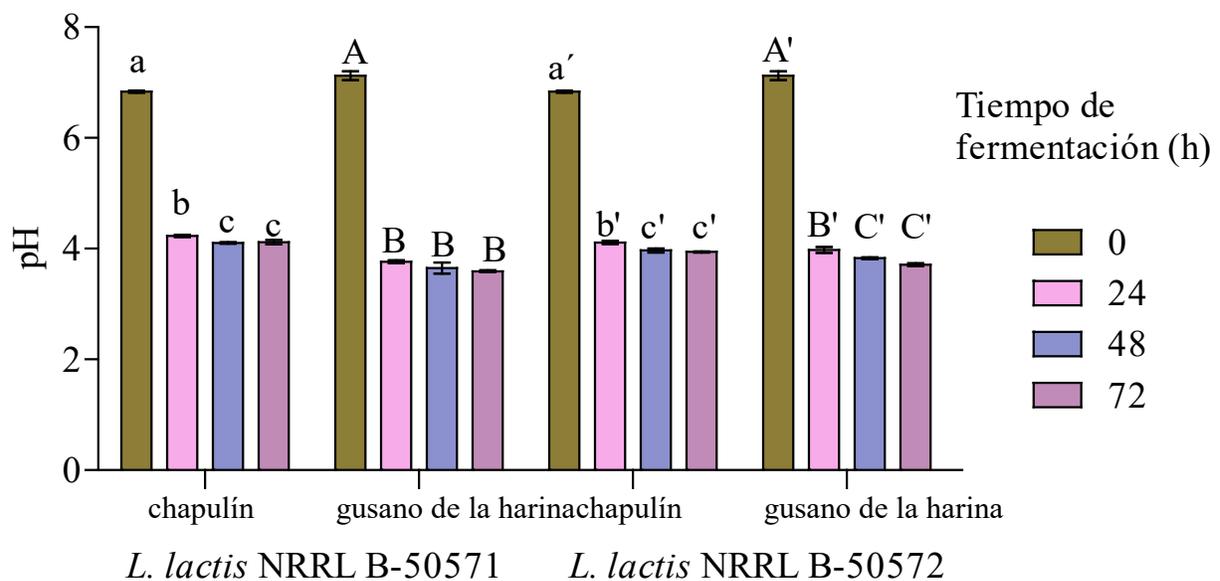


Figura 15. Disminución de pH durante la fermentación de chapulín y gusano de la harina por *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Letras diferentes indican diferencias ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación, respecto a cada insecto fermentado con la respectiva cepa. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar  $n = (3)$

### 7.3.2. Porcentaje de Hidrólisis

El porcentaje de hidrólisis se muestran en la Figura 16. Se observó un aumento de 0.2% de hidrólisis en los extractos de chapulín fermentados con NRRL B-50571 y NRRL B-50572 a partir de las 24 h de fermentación sin mostrar cambios significativos a las 48 y 72 h.

Para los extractos del gusano de la harina fermentados con *L. lactis* NRRL B-50571, el aumento fue de 0.4%, %, mientras que con *L. lactis* NRRL B-50572 fue de 0.2%. La diferencia en el porcentaje de hidrólisis podría deberse al contenido de quitina de ambas muestras, donde gusano de la harina se fermentó en la etapa larvaria, donde se ha reportado una menor cantidad de quitina, mientras que el chapulín se utilizó en etapa adulta, con un mayor contenido de quitina. Lo cual podría afectar el efecto de las quitinasas de las bacterias para utilizar la proteína presente en los insectos.

Así mismo se puede observar que en el tiempo 0 para la muestra de gusano de la harina, presenta un porcentaje de hidrólisis *per se*, a diferencia del chapulín. Éste porcentaje de hidrólisis podría deberse al tratamiento térmico aplicado a la proteína, ya que se ha reportado que en hidrolizados enzimáticos el tratamiento testigo también presenta hidrólisis, atribuyendo esto al tratamiento térmico aplicado para la inactivación de la enzima utilizada (Hall *et al.*, 2017). A su vez, podría deberse al tratamiento previo a la obtención de dichas proteínas, puesto que la muestra de gusano de la harina ya había sido tratada térmicamente de manera industrial, previo a su distribución comercial en harina, mientras que los chapulines, recibieron un tratamiento de secado al sol, para su consumo entero.

Estos resultados de porcentajes de hidrólisis, obtenidos durante la fermentación, son similares al comportamiento de ambas cepas de estudio, respecto a la leche fermentada, donde han sido estudiadas ampliamente para la obtención de péptidos IECA. En cuanto al porcentaje de hidrólisis de *L. lactis* NRRL B-50571 en leche fermentada se obtuvieron porcentajes de 0.65-0.85% mientras que para *L. lactis* NRRL B-50572 fueron de 0.75-0.85%.

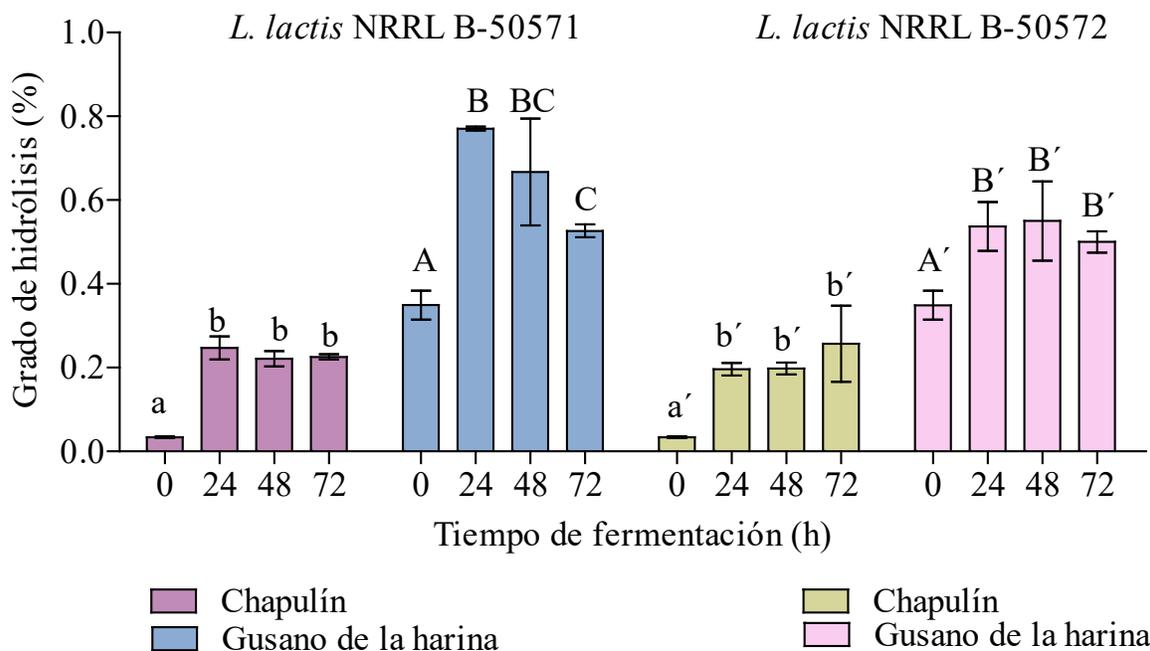


Figura. 16. Porcentaje de hidrólisis en chapulín t gusano de la harina fermentados con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Letras diferentes indican diferencias ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación, respecto a cada insecto fermentado con la respectiva cepa. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar  $n = (3)$ .

### 7.3.3. Contenido de Proteína Amínica en el Extracto < 3 kDa

El contenido de proteína amínica en la fracción < 3 kDa de las muestras fermentadas se muestra en la Figura 17. Los resultados mostraron un incremento ( $P < 0.05$ ) de 0.2 mg/mL, después de 24 h y sin cambios significativos hasta las 72 h, en chapulín fermentado por *L. lactis* NRRL B-50571 y 50572, mientras que la muestra fermentada de gusano de la harina incrementó ( $P < 0.05$ ) 0.42 mg/mL a partir de las 24 h, pero disminuyó a las 72 h de fermentación. Estos resultados, junto con el aumento en el grado de hidrólisis, sugieren que el sistema proteolítico de las cepas en estudio, tienen la capacidad de fraccionar las proteínas de gusano de la harina y chapulín y utilizarlas para su metabolismo y crecimiento.

Estudios previos han reportado que algunas de las proteinasas de *Lactococcus lactis* presentan alta similitud con las subtilisinas, enzimas proteolíticas extracelulares (serinoproteinasas) producidas

por *Bacillus spp.*, bacteria que ha sido utilizada ampliamente en la fermentación de insectos, lo que sugiere que las cepas de *Lactococcus lactis* pudieran ejercer un efecto similar en la hidrólisis de proteínas durante la fermentación (Kok, 1990; Pritchard y Coolbear, 1993; Tan et al., 1992).

Además, cierto porcentaje de proteína se encuentra unida a la quitina, y ésta, podría no estar accesible para las bacterias, sin embargo, se ha reportado que algunas cepas de *L. lactis* pueden secretar quitinasas al medio extracelular, lo cual podría contribuir a una hidrólisis de quitina junto con la proteína (da Silva, 2016).

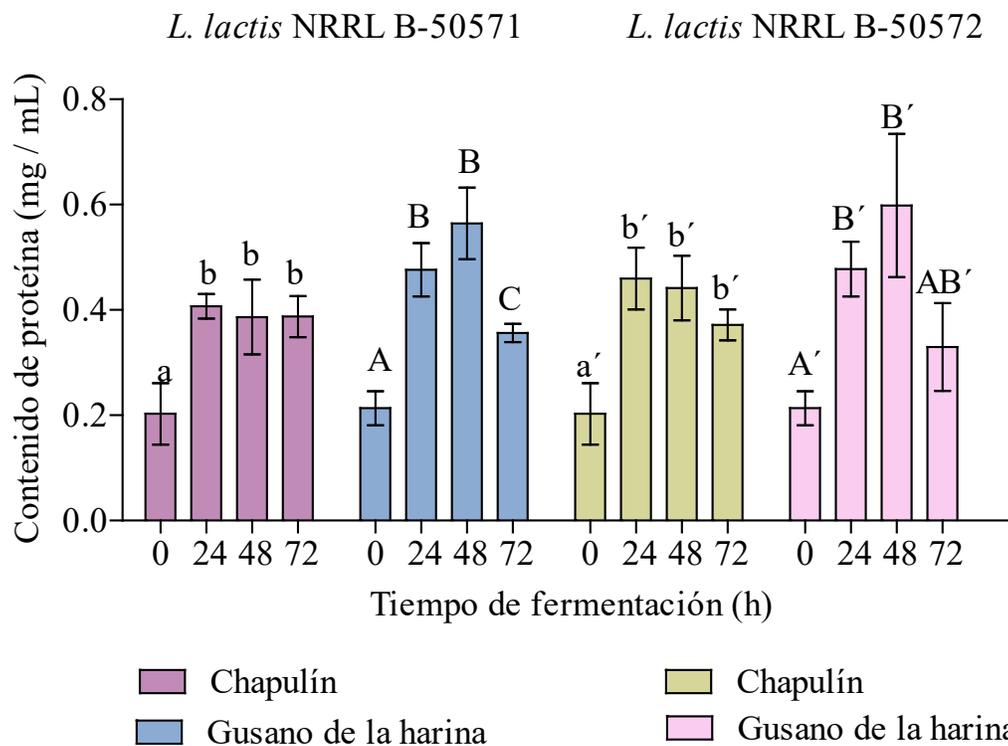


Figura 17. Contenido de proteína amínica en la fracción < 3 KDa obtenida de la harina de chapulín y gusano de la harina fermentada con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Letras diferentes indican diferencias ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación, respecto a cada insecto fermentado con la respectiva cepa. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar  $n = (3)$ .

### 7.3.4. Cinéticas de Crecimiento, Parámetros Cinéticos y Concentración Celular Durante la Fermentación

En la Figura 18 se muestran las cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio durante la fermentación, antes y después de las pre-adaptaciones a las proteínas de los insectos.

Se observa que después de las pre-adaptaciones de las bacterias a las proteínas en estudio, se obtiene un mejor crecimiento durante la fermentación, lo que podría contribuirse a que el sistema proteolítico de las bacterias tiene mayor capacidad para fraccionar la proteína de gusano de la harina y chapulín y utilizarla para su metabolismo y crecimiento.

Respecto a los parámetros cinéticos durante la fermentación (Cuadro 13), la cepa *L. lactis* 50571 mostró el menor tiempo de latencia (FL) en presencia de la proteína de gusano de la harina, mientras que no se observó diferencia entre *L. lactis* 50571 con harina de chapulín; y *L. lactis* 50572 con ambas harinas (chapulín/gusano de la harina), lo cual podría deberse a las características de las bacterias respecto a los requerimientos de crecimiento.

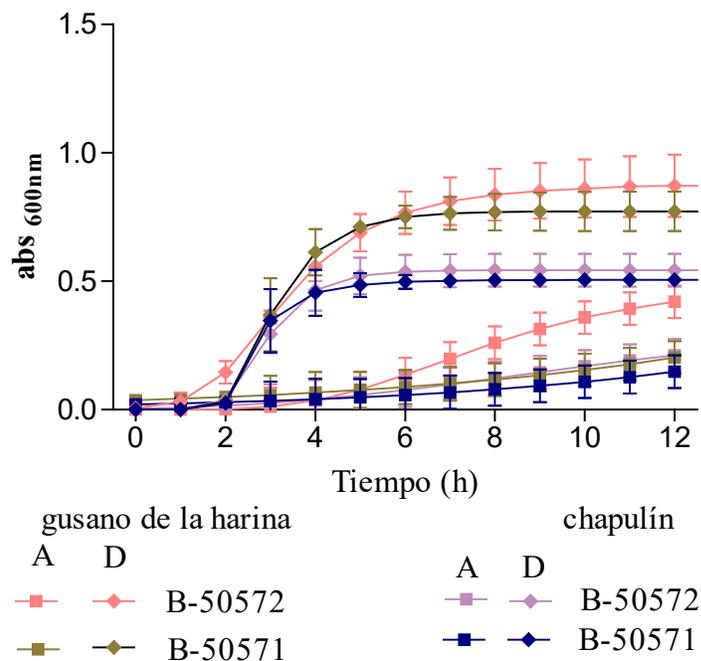


Figura 18. Cinéticas de crecimiento de *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572 con proteína de gusano de la harina y chapulín, durante la fermentación, antes (A) y después (D) de la pre-adaptación.

Cuadro 13. Parámetros cinéticos de *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572 con harina de gusano de la harina y chapulín durante la fermentación.

Cepa	Insecto	FL	MVC	TG
<i>L. lactis</i> NRRL B-50571	Chapulín	1.98 ± 0.02 <sub>a</sub>	0.29 ± 0.07 <sub>a</sub>	1.07 ± 0.31 <sub>a</sub>
	Gusano de la harina	1.34 ± 0.4 <sub>b</sub>	0.22 ± 0.05 <sub>a</sub>	1.38 ± 0.38 <sub>a</sub>
<i>L. lactis</i> NRRL B-50572	Chapulín	2.00 ± 0.15 <sub>a</sub>	0.42 ± 0.21 <sub>a</sub>	0.94 ± 0.67 <sub>a</sub>
	Gusano de la harina	2.12 ± 0.15 <sub>a</sub>	0.42 ± 0.14 <sub>a</sub>	0.75 ± 0.23 <sub>a</sub>

Letras diferentes indican diferencias (P<0.05) entre columnas para cada parámetro cinético respecto a las cepas con el insecto respectivo.

Los datos representan la media ± desviación estándar (n = 3).

FL: fase lag; MVC: máxima velocidad de crecimiento; TG: tiempo de generación.

Los cambios de concentración celular durante la fermentación, se presentan en la Cuadro 14. A las 24 h de fermentación, las bacterias aumentan su concentración celular, pues de manera inicial se encontraban en 10<sup>7</sup> UFC/mL, mientras que, a las 24h en 10<sup>8</sup> UFC/mL, y este se mantiene durante las 72 horas de fermentación, a excepción de *L. lactis* NRRL B-50571 para ambos insectos a las 72 h de fermentación, en donde la concentración celular disminuye. Estos resultados, confirman que las condiciones seleccionadas, favorecieron el crecimiento de las bacterias usando como fuente de nitrógeno, la proteína de los insectos evaluados, para su metabolismo y crecimiento.

Cuadro 14. Concentración celular de *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572 con harina de gusano de la harina y chapulín durante la fermentación

Cepa (UFC/mL)	Insecto	Tiempo de fermentación (h)			
		0	24	48	72
<i>L. lactis</i> NRRL B-50572	gusano de la harina	6.25 x 10 <sup>7</sup>	4.1 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>
	chapulín	5.8 x 10 <sup>7</sup>	1.3 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	1.3 x 10 <sup>8</sup>
<i>L. lactis</i> NRRL B-50571	gusano de la harina	8.0 x 10 <sup>7</sup>	5.8 x 10 <sup>8</sup>	1.6 x 10 <sup>8</sup>	9 x 10 <sup>7</sup>
	chapulín	8.4 x 10 <sup>7</sup>	1.8 x 10 <sup>8</sup>	3 x 10 <sup>8</sup>	3.5 x 10 <sup>6</sup>

#### 7.4. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó en el extracto < 3 KDa, debido a que este efecto se ha atribuido a péptidos de bajo peso molecular (Sepúlveda-Ahumada *et. al.*, 2012).

La actividad antioxidante de los extractos < 3 kDa de gusano de la harina y chapulín fermentados con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572 se evaluó por los métodos DPPH, TEAC, ORAC y FRAP. En general, se observó un aumento ( $p < 0.05$ ) respecto al tratamiento testigo, (T0, sin fermentar), después de la fermentación por todos los métodos para ambas bacterias y ambos insectos, a excepción del método de FRAP con ambas cepas de estudio y chapulín, en donde se observó una disminución durante la fermentación, respecto al tiempo 0 (sin fermentar), siendo mayor para las muestras de chapulín.

Cabe señalar, que el tiempo 0, de ambos insectos, presentaron actividad antioxidante, siendo mayor en las muestras de chapulín respecto al gusano de la harina, lo cual podría ser atribuido a la presencia de polifenoles, en donde el tiempo 0 de chapulín contiene 24.89  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes de ácido gálico, mientras que el gusano de la harina 10.67  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes de ácido gálico. Ésta diferencias en el contenido de polifenoles, podría deberse a la alimentación que recibieron los insectos, en donde los chapulines al ser cosechados de la naturaleza, obtienen mayor contenido de polifenoles de las plantas de las que se alimentan. Así mismo, se observó que la fermentación favoreció el aumento de polifenoles en los extractos (Cuadro 15), lo cual contribuye a la capacidad antioxidante de los extractos.

Cuadro 15. Contenido de polifenoles en gusano de la harina y chapulín fermentados con *L. lactis* NRRL B-50572 y B-50571

Tiempo de fermentación (h)	<i>L. lactis</i> NRRL B-50572		<i>L. lactis</i> NRRL B-50571	
	chapulín	gusano de la harina	chapulín	gusano de la harina
0	24.89 $\pm$ 5.54 <sub>a</sub>	10.67 $\pm$ 1.69 <sub>a</sub>	24.89 $\pm$ 5.54 <sub>a</sub>	10.67 $\pm$ 1.69 <sub>a</sub>
24	33.12 $\pm$ 3.04 <sub>b</sub>	32.75 $\pm$ 3.77 <sub>b</sub>	28.66 $\pm$ 4.50 <sub>a</sub>	25.50 $\pm$ 5.68 <sub>b</sub>
48	32.40 $\pm$ 1.27 <sub>b</sub>	23.83 $\pm$ 3.29 <sub>c</sub>	34.58 $\pm$ 3.80 <sub>b</sub>	26.08 $\pm$ 2.74 <sub>b</sub>
72	30.33 $\pm$ 3.04 <sub>a</sub>	24.97 $\pm$ 3.81 <sub>c</sub>	34.33 $\pm$ 4.00 <sub>a</sub>	15.56 $\pm$ 3.5 <sub>a</sub>

Por otra parte, pudieran encontrarse péptidos en el extracto <3kDa de ambos insectos, que contribuyan a la actividad antioxidante del T0, puesto que se encontró que el T0 presenta un porcentaje de hidrólisis, el cual podría estar relacionado con el tratamiento térmico aplicado, ya que se ha reportado que en hidrolizados enzimáticos, el tratamiento testigo también presenta hidrólisis, atribuyendo esto al tratamiento térmico aplicado para la inactivación de la enzima utilizada y a su vez, el tratamiento testigo de dichos hidrolizados presenta actividad antioxidante (Hall *et al.*, 2017).

En lo que respecta al método DPPH (Figura 19), se observó mayor actividad en las muestras de chapulín fermentado con ambas cepas, respecto a las muestras de gusano de la harina. Siendo chapulín a las 24 h de fermentación con la cepa B-50572 la que mostró la mayor actividad antioxidante por dicho método (351  $\mu$ M equivalentes de Trolox), mientras que, para las muestras de gusano de la harina fermentado por ambas cepas, la mayor actividad antioxidante se observó en el fermentado con la cepa B-50572 a las 48h de fermentación (167  $\mu$ M equivalentes de Trolox).

El método DPPH tiene como fundamento la capacidad de un antioxidante en cuanto a la estabilización del radical DPPH $\cdot$ . Se considera que dicha reacción de estabilización, es debido principalmente al mecanismo de transferencia de electrones (TE), con un aporte marginal de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) (Brand-Williams, 1995), por otra parte, se obtuvo la menor actividad antioxidante por este método, pues este ensayo evalúa la capacidad de compuestos liposolubles por ser un ensayo con base metanólica (Rodríguez-Roque *et al.*, 2012). Sin embargo, se usó este método para determinar la capacidad antioxidante de posibles péptidos liposolubles que pudieran estar presentes.

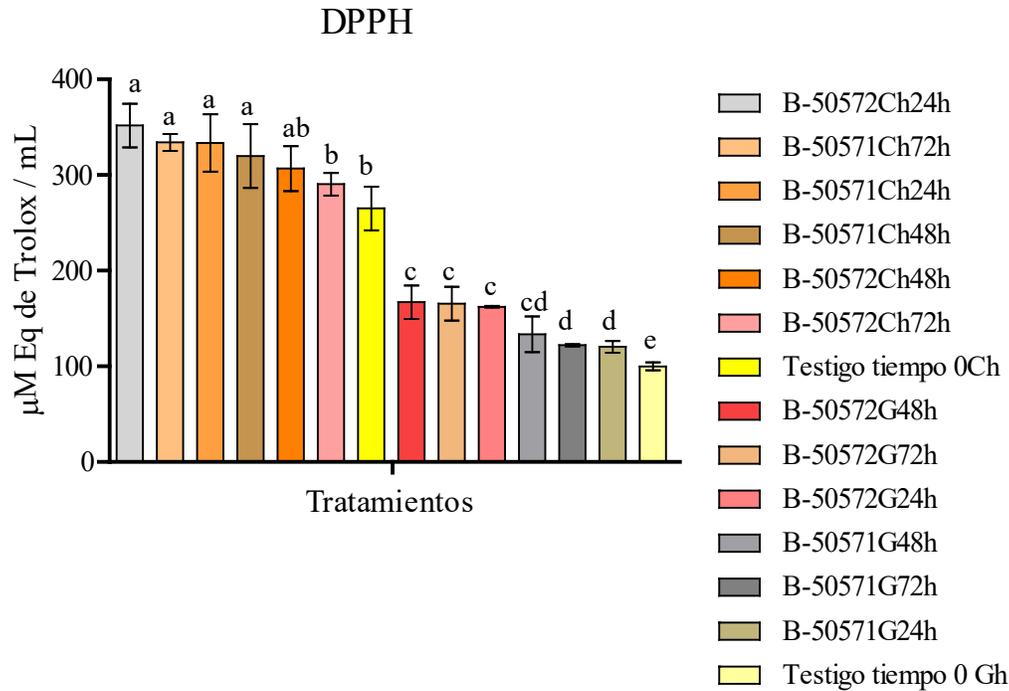


Figura 99. Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$  Eq de Trolox / mL) por el método DPPH de extractos acuosos  $<3\text{kDa}$  acuosas obtenidas de harina de gusano de la harina y chapulín fermentado con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). B-50571: *L. lactis* NRRL B-50571; B-50572: *L. lactis* NRRL B-50572; G: gusano de la harina; Ch: chapulín

La actividad antioxidante por el método TEAC, se muestra en la Figura 20. La mayor actividad antioxidante se observó a las 24 h de fermentación en las muestras de gusano de la harina ( $775 \mu\text{M}$  equivalentes de Trolox) y chapulín ( $728 \mu\text{M}$  equivalentes de Trolox) con la cepa B-50572, seguido de gusano de la harina ( $659 \mu\text{M}$  equivalentes de Trolox) fermentado durante 24 h con la cepa B-50571.

El método TEAC evalúa la capacidad de la muestra para donar un electrón (TE) y estabilizar así al radical ABTS, lo que sugiere que los péptidos presentes en los extractos  $<3\text{kDa}$  pudieran ejercer su efecto en mayor medida, debido a la transferencia de electrones para estabilizar radicales.

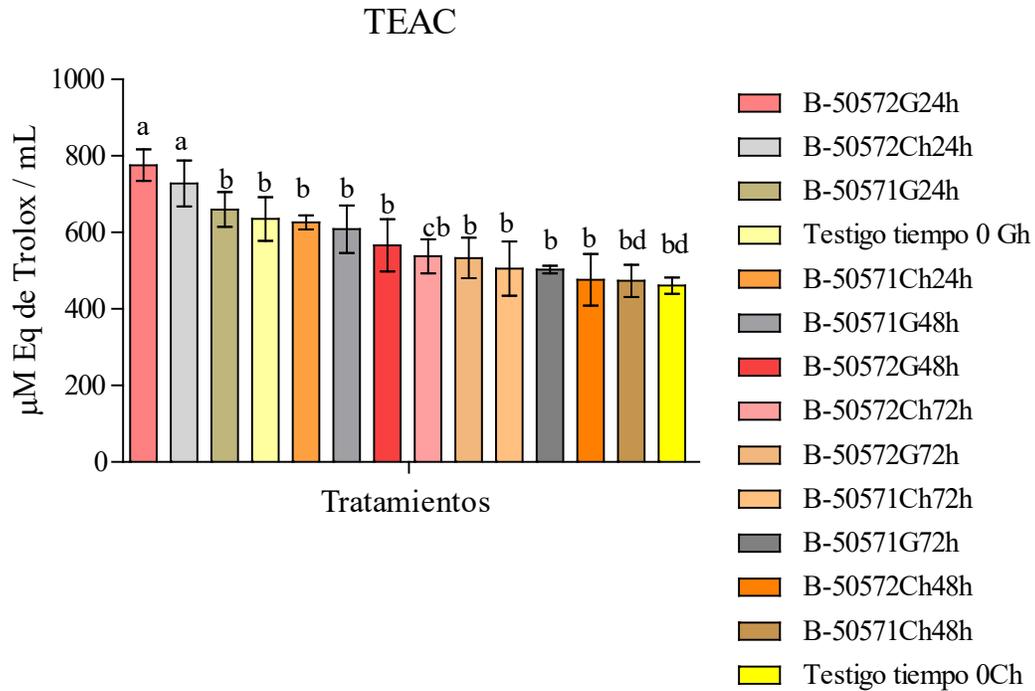


Figura. 20 Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$  Eq de Trolox / mL) por el método TEAC de extractos acuosos <3kDa acuosa obtenidas de harina de gusano de la harina y chapulín fermentado con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). B-50571: *L. lactis* NRRL B-50571; B-50572: *L. lactis* NRRL B-50572; G: gusano de la harina; Ch: chapulín

La actividad antioxidante por el método ORAC, se muestran en la Figura 21. La mayor actividad antioxidante se registró en las muestras de chapulín fermentadas durante 24 h por la cepa B-50572 (373  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox), sin haber diferencia con la muestra de gusano de la harina a las 48 h de fermentación con la cepa B-50571 (362  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox).

El método ORAC evalúa la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo, teniendo como mecanismo de actividad antioxidante, la terminación de cadena por transferencia de átomos de hidrógeno. Así mismo mide la capacidad de la muestra para estabilizar los radicales libres y disminuir la velocidad de degradación de una proteína (fluoresceína) (Londoño-Londoño, 2012). Por lo que, se ha reportado que éste método, tiene mayor relevancia fisiológica (Zulueta *et al.*, 2009)

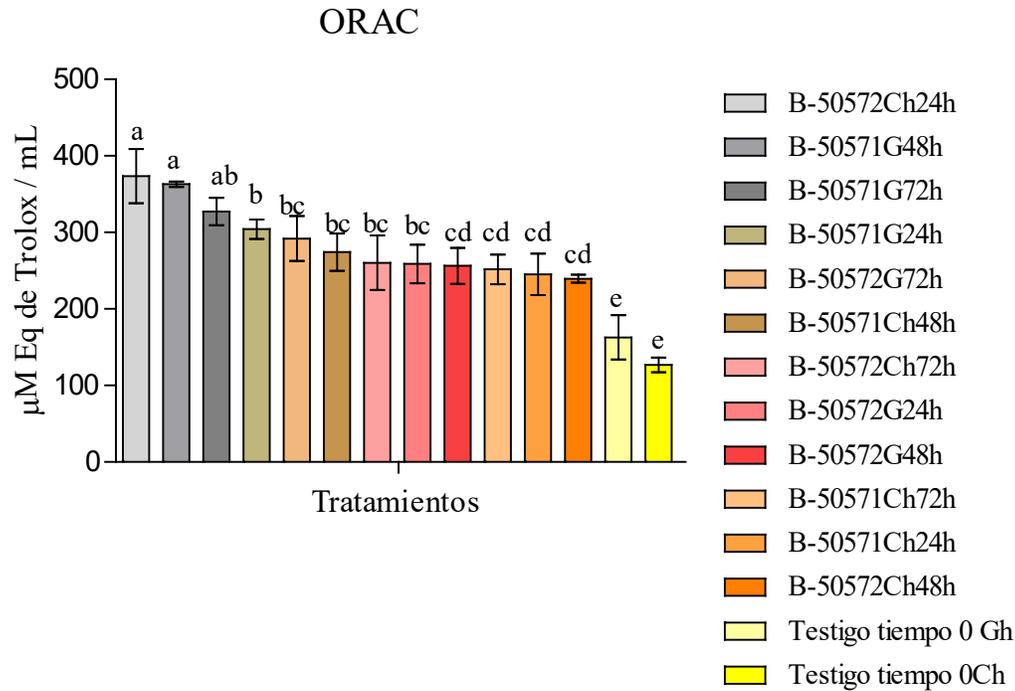


Figura 10 Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$  Eq de Trolox / mL) por el método ORAC de extractos acuosos  $<3\text{kDa}$  acuosas obtenidas de harina de gusano de la harina y chapulín fermentado con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). B-50571: *L. lactis* NRRL B-50571; B-50572: *L. lactis* NRRL B-50572; G: gusano de la harina; Ch: chapulín

Finalmente, los resultados obtenidos por el método de FRAP se muestran en la Figura 22. En este caso, a diferencia de los métodos anteriores, se observó una disminución en cuanto a la actividad antioxidante en la muestra de chapulín durante la fermentación, respecto al tiempo 0, sin embargo, después del T0, la muestra que presentó mayor actividad antioxidante fue chapulín fermentado por 24 h con B-50572 ( $154 \mu\text{M}$  equivalentes de Trolox) sin haber diferencias con los demás tiempos de fermentación, ni con la cepa B-50571. Sin embargo, en las muestras de gusano de la harina, sí se observó un aumento ( $p < 0.05$ ) durante la fermentación por ambas cepas de estudio, siendo mayor a las 24 h con la cepa B-50572.

En lo que respecta al método de FRAP, éste actúa típicamente mediante la TE. Por otra parte, se ha reportado que la capacidad de reducir el hierro tiene baja correlación con la estabilización de radicales libres; sin embargo, el poder reductor podría reflejar la capacidad de los péptidos presentes en los extractos, para regular el estado redox del plasma o tejidos, pues la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena, así mismo podrían

tener la capacidad de quelar metales de transición como el hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) o cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ), los cuales participan en la reacción de Fenton (Benzie y Szeto, 1999).

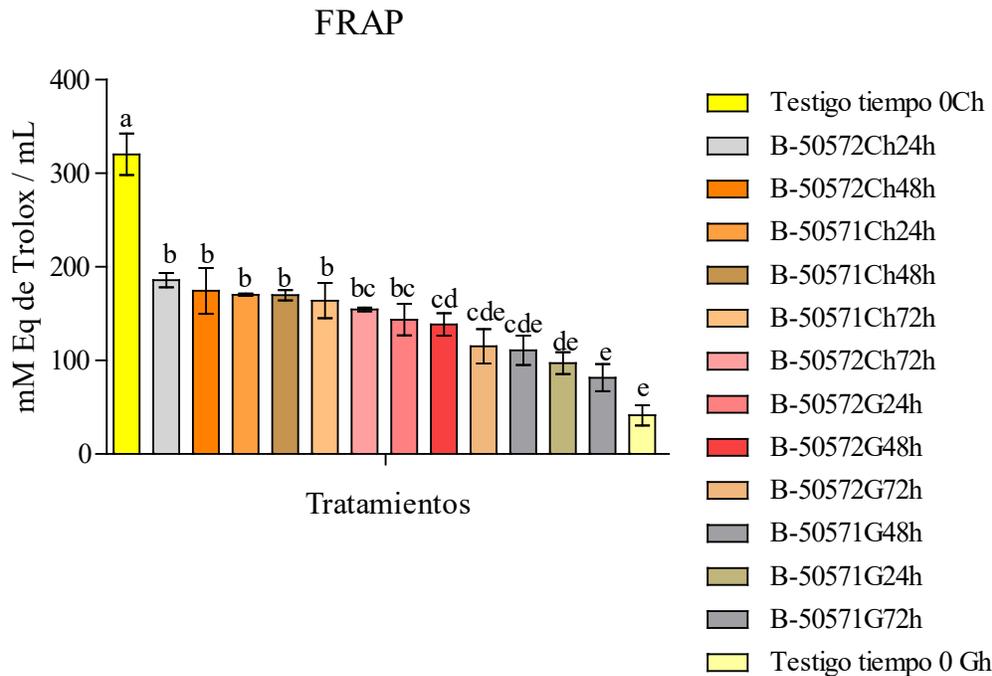


Figura 22. Actividad antioxidante ( $\mu\text{M}$  Eq de Trolox / mL) por el método FRAP de extractos acuosos  $<3\text{kDa}$  acuosas obtenidas de harina de gusano de la harina y chapulín fermentado con *L. lactis* NRRL B-50571 y B-50572. Literales diferentes indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). B-50571: *L. lactis* NRRL B-50571; B-50572: *L. lactis* NRRL B-50572; G: gusano de la harina; Ch: chapulín

Con base en los resultados anteriores, se podría inferir que los péptidos presentes en los extractos  $<3\text{kDa}$  de los insectos fermentados, actúan mayormente por el mecanismo de TE.

Finalmente, aunque se tiene menor porcentaje de hidrólisis y contenido de proteína amínica en la fracción  $< 3\text{KDa}$  en los fermentados de chapulín, se encontró mayor actividad que los fermentados de proteína de gusano de la harina.

Estos resultados comparados con otros estudios muestran que a menor tiempo de fermentación se tiene una actividad antioxidante comparable a otros estudios. Por ejemplo, el estudio reportado por Kim et al. (2017) observaron que la fermentación por 3 días de gusanos de seda (*Bombyx mori* L.)

con *Bacillus subtilis* KACC 91157 aumentó la capacidad antioxidante, así mismo Tae-Hoon et al. (2017) encontraron la mayor actividad antioxidante a los 3 días de fermentación de gusanos de seda (*Bombyx mori* L.) con *B. subtilis*, dichos resultados, en cuanto a actividad antioxidante, son similares a los obtenidos en el presente estudio; sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron resultados similares en un menor tiempo de fermentación, lo cual podría atribuirse a la capacidad fermentativa de las cepas utilizadas.

Por otra parte, con el uso de la fermentación en estado sólido de larvas *Protaetia brevitarsis seulensis* durante 3 días utilizando *Lactobacillus plantarum* JBMI F3, *Lactobacillus plantarum* JBMI F5, *Lactobacillus gasseri* Ba9, *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, *Saccharomyces cerevisiae* KACC 9302 y *Bacillus subtilis* KACC 91157 aumentó la actividad antioxidante de los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos (So-Yeon et al. 2018). Mientras que un estudio realizado por Cha et al. (2011), la mayor actividad antioxidante de muestras de gusano de seda fermentados con *Bacillus subtilis* y *Aspergillus kawachii* fue a los 12 días, siendo mayor el tiempo que en el presente estudio.

En lo que respecta a la actividad antioxidante obtenida por la fermentación con *A. kawachii*, es similar a la obtenida en el presente estudio, pero dicha actividad se obtiene a los 12 días de fermentación, mientras que, en el presente estudio a las 24 h. Por otra parte, la actividad antioxidante obtenida por *B. subtilis* a los 12 días de fermentación, es mayor que la obtenida a las 24 h en el presente estudio. Por lo que la actividad antioxidante obtenida por la fermentación de insectos, podría verse influida por las condiciones y el tipo de fermentación, tipo y etapa del insecto utilizado, así como del tipo de microorganismo utilizado.

Lo anterior sugiere que las cepas en estudios pueden ser utilizadas en la fermentación de insectos y obtener péptidos bioactivos en un menor tiempo, los cuales puedan ser utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales o nutraceuticos.

#### 7.5. Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina

Con base en los resultados de la actividad antioxidante, se observó que a las 24 h de fermentación se obtenía la mayor actividad, por lo que se seleccionaron los extractos <3kDa de chapulín y gusano

de la harina fermentados con *L. lactis* B-50572 para evaluar la actividad inhibidora de la ECA (IECA).

En lo que respecta a la actividad IECA, a las 24 h de fermentación, las muestras de gusano de la harina mostraron  $17.5 \pm 0.7$  % de inhibición, mientras que las muestras de chapulín fueron mayores con el  $28.5 \pm 3.2$  %, con un  $IC_{50}$  de 1.34 mg/mL y 0.78 mg/mL, respectivamente. Así mismo, se pudo observar que las muestras fermentadas de chapulín presentaron la mayor actividad ( $p < 0.05$ ) IECA en conjunto con la actividad antioxidante.

Es importante mencionar que, hasta el momento de nuestra revisión, no se ha reportado actividad inhibidora de la ECA de péptidos obtenidos a partir de la fermentación de insectos.

Diversos estudios han demostrado que los hidrolizados de proteína de insectos, favorece la liberación de péptidos IECA, con porcentajes de inhibición mayores al 50% e  $IC_{50}$  inferiores a los obtenidos en el presente estudio, lo que podría atribuirse al uso de enzimas comerciales purificadas (Vercruyse *et al.*, 2005; Cito *et al.*, 2017).

Por lo anterior, a pesar de que los resultados obtenidos en el presente estudio son relativamente inferiores a los obtenidos por hidrólisis enzimática, podrían explorarse diversas alternativas para aumentar el grado de hidrólisis y disminuir el  $IC_{50}$ , para posteriormente evaluarse el efecto que pudiera tener la digestión gastrointestinal en la bioactividad de los péptidos presentes en los extractos fermentados.

Hasta el momento se desconocen la secuencia de péptidos presentes en los extractos  $<3kDa$  de los insectos fermentados en el presente estudio. Sin embargo, se ha reportado que la actividad IECA, se ve influenciada por diversos factores tales el residuo C-terminal, puesto que, la ECA es más a fin a di y tri-péptidos que contienen residuos hidrófobos como el triptófano, la tirosina, la fenilalanina o la prolina (Haque y Chand,2008).

Así mismo, se ha reportado que aminoácidos con carga positiva, favorecen a la inhibición de la ECA (Vermeirssen, *et al.*,2004). Mientras que, en los péptidos con actividad antioxidante, se ha reportado que están presentes residuos de histidina, prolina, tirosina, metionina, y cisteína, por lo que, ha sido reportado que, péptidos con actividad antioxidante pudieran presentar actividad IECA (Sarmadi y Ismail, 2010). Finalmente, podrían realizarse estudios de optimización de las condiciones de fermentación para favorecer el aumento de péptidos IECA durante la fermentación.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la etapa de selección de las condiciones de pre-adaptación de las bacterias a las proteínas de insectos, utilizar 0.5% de las harinas de insectos y 3.5% de dextrosa, favorecen el crecimiento de las bacterias.

Se observó actividad antioxidante en todos los tiempos de fermentación, siendo al tiempo de 24 h donde se mostró la mejor actividad, siendo más alta en las muestras de chapulín fermentado con la cepa B-50572. Por otra parte, a pesar de que los resultados de inhibición de la ECA, no fueron los esperados, se pudo observar que los extractos de gusano de la harina y chapulín fermentados con la cepa B-50572, presentan actividad IECA.

Finalmente, la fermentación de insectos, en este caso de gusano de la harina y chapulín, con las cepas de estudio, podrían ser una nueva fuente de obtención de péptidos antioxidantes y antihipertensivos, para la formulación y desarrollo de alimentos funcionales y/o nutraceúticos.

## 9. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere que en investigaciones posteriores se evalúen distintas condiciones de optimización durante la fermentación, así como explorar la fermentación en estado sólido. Adicionalmente, es importante evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal en las bioactividades de los péptidos presentes en los extractos, así como las vías de absorción y finalmente evaluar su efecto *in vivo* (utilizando modelos murinos y estudios clínicos). Dicha información podría ayudar a definir el uso potencial de estas cepas como cultivos para producir péptidos bioactivos a partir de proteínas de insectos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- A. O. A. C. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. E.U.A
- Aulitto, M., Fusco, S., Nickel, D. B., Bartolucci, S., Contursi, P., & Franzén, C. J. (2019). Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 1-11.
- Bednárová, M. (2013). Possibilities of using insects as food in the Czech Republic. (Tesis doctoral) Mendel University, Brno, República Checa.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 296-313.
- Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Torres-Inguanzo, E. H., Astiazarán-García, H., Esparza-Romero, J., & Vallejo-Cordoba, B. (2018). Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure-lowering effect of fermented milk with *Lactococcus lactis*: a pilot study. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2819-2825.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Benzie, I. F., & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), 633-636.
- Boeriu, C. G., Frissen, A. E., Boer, E., van Kekem, K., van Zoelen, D. J., & Eggen, I. F. (2010). Optimized enzymatic synthesis of C-terminal peptide amides using subtilisin A Form *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1-2), 33-42.
- Borremans, A., Lenaerts, S., Crauwels, S., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2018). Marination and fermentation of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*, 92, 47-52.
- Borremans, A., Sam, C., Dries, V., Ruben, S., Christel, V., Mik, V. D. B., & Leen, V. C. (2019). Comparison of Six Commercial Meat Starter Cultures for the Fermentation of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Paste. *Microorganisms*, 7(11), 540.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Carreño, D. (29 abril, 2020). La historia de la bióloga que vende gusano de harina para consumo humano. México. Goula, especialistas en la industria alimentaria. <https://goula.lat/la-historia-de-la-biologa-que-fundo-su-empresa-y-vende-gusano-de-harina-para-consumo-humano/> - <http://optiprot.com/>
- Cha, JY, Kim, YS, Ahn, HY, Kang, MJ, Heo, SJ y Cho, YS. (2011). Propiedades fisicoquímicas y actividades fisiológicas del polvo de gusano de seda fermentado por cepas comestibles útiles. *Journal of Life Science*, 21 (1), 81-88.

- Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S., & Cho, Y. S. (2009). Biological activity of fermented *silkworm* powder. *Journal of Life Science*, *19*(10), 1468-1477.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(5), 975-983.
- Chauhan, V., & Kanwar, S. S. (2020). Bioactive peptides: Synthesis, functions and biotechnological applications. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 107-137). Elsevier.
- Chauhan, V., & Kanwar, S. S. (2020). Bioactive peptides: Synthesis, functions and biotechnological applications. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*. Elsevier. (pp. 107-137).
- Cho, J. H., Zhao, H. L., Kim, J. S., Kim, S. H., & Chung, C. H. (2018). Characteristics of fermented seasoning sauces using *Tenebrio molitor* larvae. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *45*, 186-195.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*(1-4), 217-246.
- Costa-Neto, E. M., & Dunkel, F. V. (2016). Insects as food: history, culture, and modern use around the world. In *Insects as sustainable food ingredients*. Academic Press. (pp. 29-60).
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, *20*(7), 1637-1648.
- da Silva, A. F. (2016). Caracterización estructural y funcional de los genes que codifican las quitinasas en *lactococcus lactis* y *bacillus halodurans* (Tesis doctoral) Universidad de Vigo. España.
- Dai, C., Ma, H., Luo, L., & Yin, X. (2013). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, *236*, 681-689
- Dai, C., Ma, H., Luo, L., & Yin, X. (2013). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, *236*(4), 681-689.
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, *6*(5), 32.
- Elorduy, J. R., Pino, J. M., & Conconi, M. (2006 A). Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica Mexicana*, *45*(3), 291-318.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional Biochemistry*, *19* (10), 643-654.
- FAO y WUR. (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Rome: FAO.
- FAO. (2017). *Edible Insects Stakeholders Directory (Version 2.0)*. Retroceded from <http://www.fao.org/edible-insects/stakeholder-directory/en/>

- Feng, Y., Chen, X. M., Zhao, M., He, Z., Sun, L., Wang, C. Y., & Ding, W. F. (2018). Edible insects in China: Utilization and prospects. *Insect science*, 25(2), 184-198.
- Fernández VG: Evaluación de un recurso comestible autóctono propio de lagos alcalinos (*Hemiptera Corixidae-Notonectidae*). (1989), Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, Departamento de Biología, México DF
- Fernández, M., & Zuñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155-183.
- FOAG (Federal Office for Agriculture) (2017) Information letter 2017/1; production and processing of insects for use as foodstuffs. <https://www.blw.admin.ch/blw/it/home/nachhaltigeproduktion/tierischeproduktion/insekn.html>. Acceso 06 feb 2020
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand) (2018) Record of views formed in response to inquiries (updated October 2018). Acceso 06 feb 2020
- Gere, A., Radványi, D., & Héberger, K. (2019). Which insect species can best be proposed for human consumption? *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 358-367.
- Gullan PJ, Cranston PS, McInnes KH. (2014). *The Insects: An Outline of Entomology*. WileyBlackwell, Chichester, 595 pp.
- Gutiérrez-Méndez N. (2008). Capacidad de *Lactococcus lactis* de biosintetizar a-cetoglutarato asociado con su potencial de producir aroma, (tesis de doctorado) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora.
- Hall, F. G., Jones, O. G., O'Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414-422.
- Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein. *Food Chemistry*, 262, 39-47.
- Halloran A, Hanboonsong Y, Roos N, Bruun S. (2017). Life cycle assessment of cricket farming in north-eastern Thailand. *Journal of Cleaner Production* 156:83–94.
- Halloran, A., Flore, R., Vantomme, P., & Roos, N. (Eds.). (2018). *Edible insects in sustainable food systems*. Cham: Springer.
- Halloran, A., Vantomme, P., Hanboonsong, Y., & Ekesi, S. (2015). Regulating edible insects: the challenge of addressing food security, nature conservation, and the erosion of traditional food culture. *Food Security*, 7(3), 739-746.
- Han, S. R., Yun, E. Y., Kim, J. Y., Hwang, J. S., Jeong, E. J., & Moon, K. S. (2014). Evaluation of genotoxicity and 28-day oral dose toxicity on freeze-dried powder of *Tenebrio molitor* larvae (Yellow Mealworm). *Toxicological Research*, 30(2), 121.
- Hanboonsong Y (2010) Edible insects and associated food habits in Thailand. In: Durst PB, Johnson DV, Leslie RN, Shono K (eds) *Edible forest insects: humans bite back*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Bangkok, pp 173–182
- Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 92(11), 2326-2331.

- Hurtado, M. M. C., Moreno, P. C., Daschner, Á., Fandos, M. E. G., Gómez, A. P., Lázaro, D. R., & Buelga, J. Á. S. (2018). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a los riesgos microbiológicos y alergénicos asociados al consumo de insectos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (27), 11-40.
- Jay, J. M. (2005). *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media, Inc. Seventh Edition. New York. 790 pp.
- Jongema, Y. (2012). List of edible insects of the world. from Wageningen University Y Research.
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535-547.
- Kęska, P., y Stadnik, J. (2017). Characteristic of antioxidant activity of dry-cured pork loins inoculated with probiotic strains of LAB. *CyTA-Journal of Food*, 15(3), 374-381.
- Kim - Taehoon, Heeyoung An, Youngwan Kim, Soyeon Sim, Hyundong Cho, Mando Kim, & Youngsoo Cho. (2017a) Un efecto de mejorar la función hepática en las ratas inducidas por hígado graso no alcohólico por el extracto de gusano de seda fermentado Bacillus. *Journal of Life Science*, 27 (9), 1031-1039.
- Kim -Taehoon, Heeyoung Ahn, Youngwan Kim, Soyeon Sim, Seokwon Il y Youngsoo Cho. (2017b) Características fisicoquímicas y actividades fisiológicas del bacilo de gusano de seda fermentado por región montañosa. *Journal of Life Science*, 27 (12), 1470-1478.
- Kim, D. H., Kim, S. H., Jung, K. W., Kim, M. S., & Shin, H. S. (2011). Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, 102(18), 8646-8652.
- Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 15-41
- Kouřimská, L., y Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, 4, 22-26.
- Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y., & Liao, S. (2017). Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male *silkmoth*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e13081.
- Machado, A., Liria, C.W., Proti, P.B., Remuzgo, C., Miranda, M.T.M. (2004). Chemical and enzymatic synthesis of peptides: basic principles and applications. *Quimica Nova* 27, 781-789.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). *Brock biology of microorganisms* 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.
- Megido, R. C., Gierts, C., Blecker, C., Brostaux, Y., Haubruge, É., Alabi, T., & Francis, F. (2016). Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Quality and Preference*, 52, 237-243.
- Meyer-Rochow, V.B. (2009). Food taboos. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (5), 18-28.

- Miglietta PP, De Leo F, Ruberti M, Massari S (2015) Mealworms for food: a water footprint perspective. *Water* 7:6190–6203.
- Mintah, B. K., He, R., Dabbour, M., Golly, M. K., Agyekum, A. A., & Ma, H. (2019). Effect of sonication pretreatment parameters and their optimization on the antioxidant activity of *Hermitia illucens* larvae meal protein hydrolysates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14093.
- Mishyna, M., Martinez, J. J. I., Chen, J., & Benjamin, O. (2019). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*, 116, 697-706.
- Mouritsen, O. G., Duelund, L., Calleja, G., & Frøst, M. B. (2017). Flavour of fermented fish, insect, game, and pea sauces: garum revisited. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 9, 16-28.
- Muzzarelli, R. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 995-1012.
- Nielse, P.M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improve Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 641-646.
- Nielsen, F., Tomás-Pejó, E., Olsson, L., & Wallberg, O. (2015). Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 219.
- Oonincx DGAB & De Boer IJM. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans - a life cycle assessment. *PLoS One* 7(12):e51145.
- Otvos Jr., L. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* 6: 497-511.
- Palmer, L. (2016). Edible Insects as a Source of Food Allergens. <https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/78/>
- Paoletti, M. G., Norberto, L., Damini, R., & Musumeci, S. (2007). Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(3), 244-251.
- Pedrosa, M., Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., & Quirce, S. (2015). Shellfish allergy: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 49(2), 203-216.
- Phiriyangkul P, Srinroch C, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P. (2015). Effect of food thermal processing on allergenicity proteins in Bombay locust (*Patanga Succincta*). *International Journal of Food Engineering* 1(1):23–28.
- Pritchard GG, Coolbear T (1993) The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:179–206
- Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244(6), 999-1013.
- Ramos-Elorduy J: 2006, La Etnoentomología en la Alimentación, la Medicina and el Reciclaje.

Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artropodos De México: Hacia Una Sintesis de su Conocimiento. Edited by: Llorente BJ, Morrone JJ, Yáñez OO, Vargas FI. Ed. CONABIO, UNAM, IV: 329-413.

- Ramos-Elorduy, J. & J.M. Pino M. 2001 Insectos comestibles del Estado de Hidalgo, Anales del Instituto de Biología UNAM, Serie Zoología, 72(1): 43-84.
- Ramos-Elorduy, J. (2007). Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 51.
- Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Prado, E. E., Perez, M. A., Otero, J. L., & De Guevara, O. L. (1997). Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. *Journal of food composition and analysis*, 10(2), 142-157.
- Janssen, R. H., Vincken, J. P., van den Broek, L. A., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2275-2278.
- Ramos-Elorduy, Pino JM: 2003, Enfermedades tratadas con insectos en el Continente Americano. *Entomol Mex.*, II: 604-611.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M & Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ribeiro, J. C., Lima, R. C., Maia, M. R., Almeida, A. A., Fonseca, A. J., Cabrita, A. R. J., & Cunha, L. M. (2019). Impact of defatting freeze-dried edible crickets (*Acheta domesticus* and *Grylloides sigillatus*) on the nutritive value, overall liking and sensory profile of cereal bars. *LWT*, 113, 108335.
- Rodríguez-Figueroa J. C. (2008). Evaluación de la actividad antihipertensiva *in vitro* en leche fermentada con *lactococcus lactis* de diversos orígenes. (Tesis de Maestría), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M. J., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2012). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5536-5543.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A. F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I., & Vallejo-Cordoba, B. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5032-5038.
- Rodríguez-Roque, M., Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., (2012). Métodos para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos. En *Antioxidantes en alimentos y salud*. Editores, Álvarez Parilla E., González-Aguilar, G. A., de la Rosa, L., Ayala Zavala, J. F. AGT Editores, México, D.F.
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802-823.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.

- Sepúlveda-Ahumada, D., García-Amezquita, L., Martínez-Alvarenga, M., Martínez, R. E., & y Peña-Ramos, E. (2012). Péptidos con actividad antioxidante. En G. A. Aguilar, *Antioxidantes en alimentos y salud*. Editorial Clave (págs. 197-230).
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Calorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158
- Smetana S, Palanisamy M, Mathys A, Heinz V. (2016). Sustainability of insect use for feed and food: life cycle assessment perspective. *Journal of Cleaner Production* 137:741–751.
- Smetana, S., Larki, N. A., Pernutz, C., Franke, K., Bindrich, U., Toepfl, S., & Heinz, V. (2018). Structure design of insect-based meat analogs with high-moisture extrusion. *Journal of Food Engineering*, 229, 83-85.
- So-yeon S. Seong-ho J., Hee-young A., Hyun-dong C., Kwon-il S. Y Young-soo C. (2019). Optimización de las condiciones de fermentación *Protaetia brevitarsis seulensis* larvas utilizando *Bacillus subtilis*, *Korean Journal of Food Preservation*. 26 (1), 123-133.
- So-yeon S., Hee-young A., Kwon-il S. Y Young-soo C. (2018). Propiedades fisicoquímicas y efectos de la actividad fisiológica del extracto de babosa fermentada utilizando microorganismos útiles. *Journal of Life Sciences*, 28 (7), 827-834.
- Stull, V. J., Finer, E., Bergmans, R. S., Febvre, H. P., Longhurst, C., Manter, D. K., y Weir, T. L. (2018). Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a double-blind, randomized crossover trial. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Tan P, van Alen-Boerrigter I, Poolman B, Siezen R, de Vos W, Konings W (1992) Characterization of the *Lactococcus lactis* pepN encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N. *FEBS Letters*. 306:9–16
- Tao, M., Wang, C., Liao, D., Liu, H., Zhao, Z., & Zhao, Z. (2017). Purification, modification and inhibition mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, 54, 172-179.
- Urrejola, J. (2019) México: el país líder de la revolución insectívora, México. Made for minds. <https://p.dw.com/p/3RNnk> - <https://www.griyum.com.mx/>
- Van Broekhoven S, Bastiaan-Net S, de Jong NW, Wichers HJ (2016) Influence of processing and *in vitro* digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food Chemistry* 196:1075–1083.
- Van der Weele, C., Feindt, P., van der Goot, A. J., van Mierlo, B., & van Boekel, M. (2019). Meat alternatives: an integrative comparison. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 505-512.
- Van Huis, A., & Oonincx, D. G. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5), 43.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. y Vantomme, P. (2013). Insectos comestibles: perspectivas futuras para la seguridad alimentaria y alimentaria (núm. 171). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Van H. Vlieg, J. E. T., & Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavor and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1290-1297.
- Van Z. HHE, Mollenhorst H, Klootwijk CW, Van Middelaar CE, De Boer IJM (2016) Global food

supply: land use efficiency of livestock systems. [The International Journal of Life Cycle Assessment](#) 21:747–758.

- Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Martínez-Hernández, J. L., Aguilar, C. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: a sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1039-1051.
- Vercruyssen, L., Smagghe, G., Beckers, T., & Van Camp, J. (2009). Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry*, 114(1), 38-43.
- Vercruyssen, L., Smagghe, G., Herregods, G., & Van Camp, J. (2005). ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5207-5211.
- Wang, J., Wang, Y., Dang, X., Zheng, X., & Zhang, W. (2013). Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties. *BMC Research Notes*, 6(1), 197.
- Wang, Q., Zhu, F., Xin, Y., Liu, J., Luo, L., & Yin, Z. (2011). Expression and purification of antimicrobial peptide buforin IIb in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2121.
- Wendin, K., Birch, K., & Olsson, V. (2019). Insects as food: a review of sustainability, nutrition and consumer attitudes. In *Food and Society Proceedings* (pp. 145-152).
- Williams, A. G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., & Banks, J. M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12(10), 841-852.
- Wu, J., Aluko, R.E. y Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography Assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950 (1-2), 125-130.
- Wu, T. Y., Guo, N., Teh, C. Y., & Hay, J. X. W. (2013). Theory and fundamentals of ultrasound. In *Advances in ultrasound technology for environmental remediation*. Springer, Dordrecht. (pp. 5-12).
- Xiaoming, C., Ying, F., Hong, Z., & Zhiyong, C. (2010). Review of the nutritive value of edible insects. *Forest insects as food: humans bite back*, 85-91.
- Yi, L., Van Boekel, M. A., Boeren, S., & Lakemond, C. M. (2016). Protein identification and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1285-1297.
- Zhao, H., Cho, J. H., & Chung, C. H. (2018). Characteristics of seasoning pastes fermented by *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* using edible insects. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 297-307.
- Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2017b). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients*, 9(9), 970.
- Zielińska, E., Karaś, M., & Jakubczyk, A. (2017a). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and*

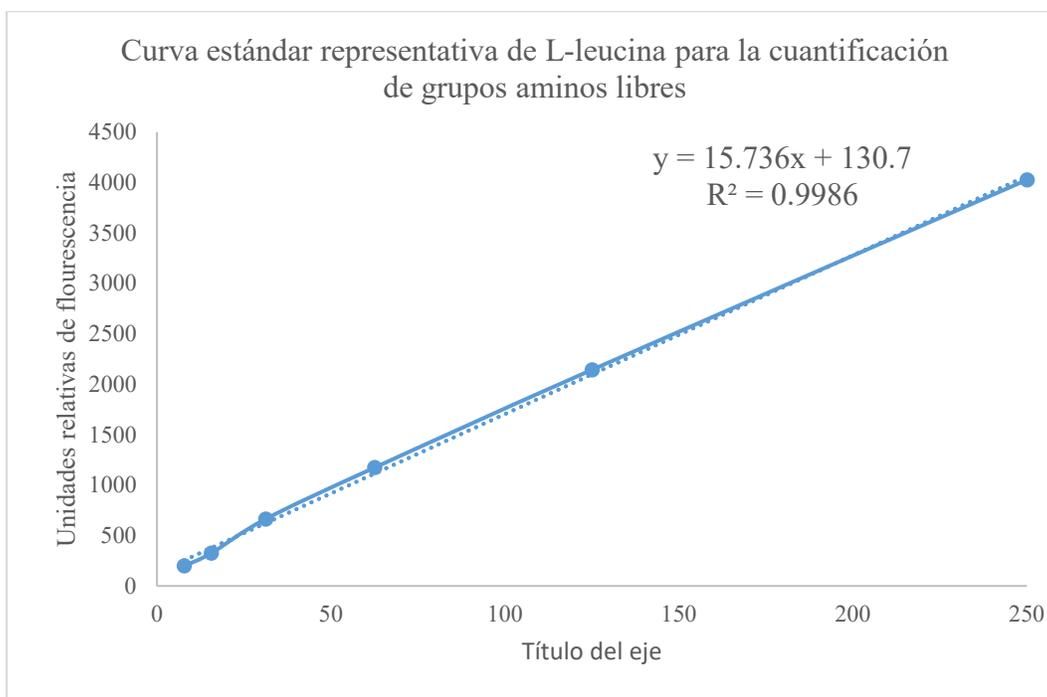
Technology, 52(2), 306-312.

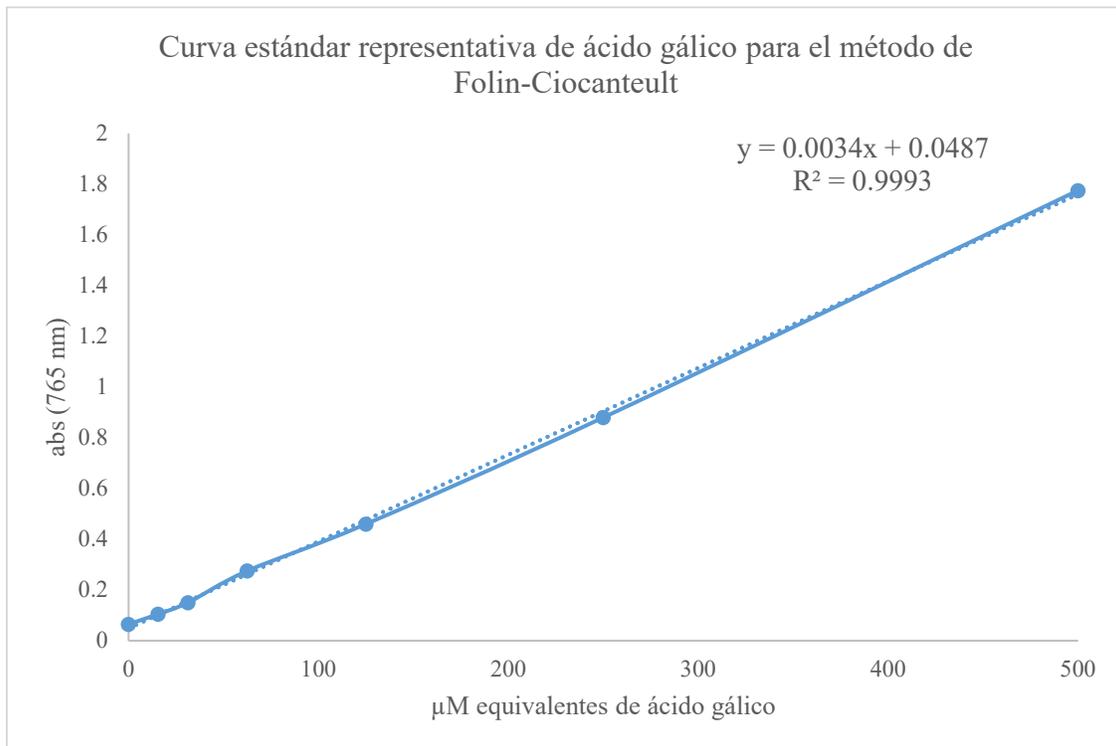
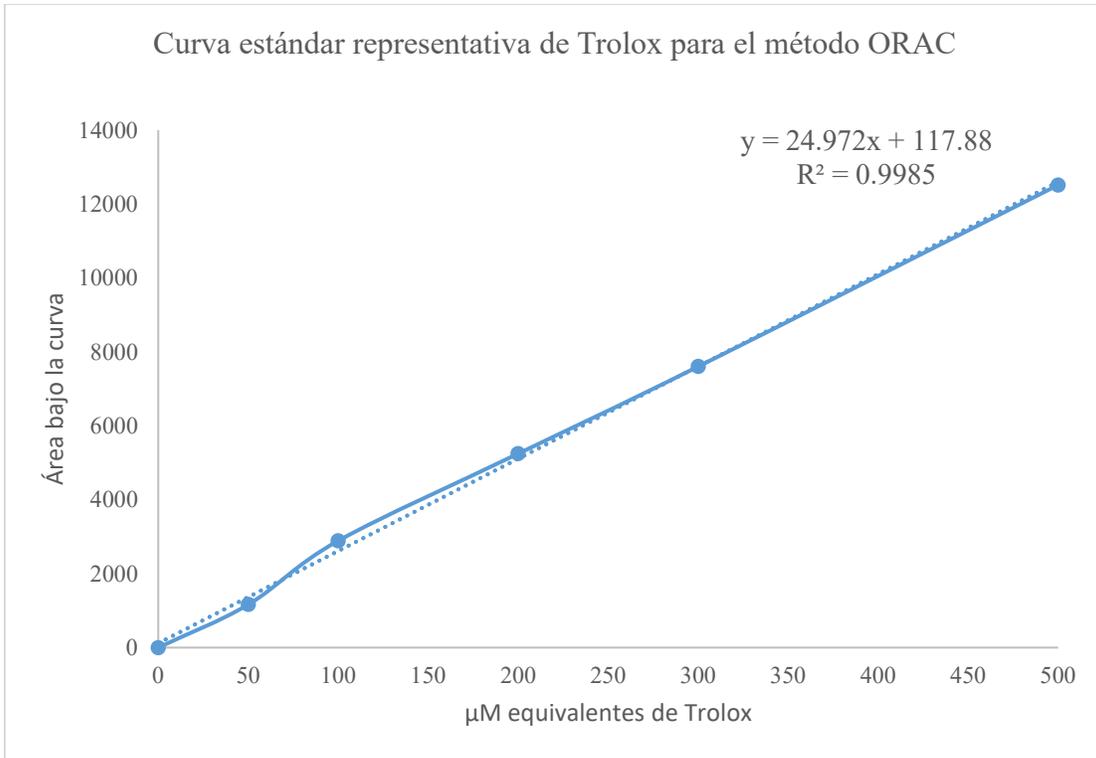
Zielińska, E., Karaś, M., Jakubczyk, A., Zieliński, D., & Baraniak, B. (2018). Edible Insects as Source of Proteins. *Bioactive Molecules in Food*, 1-53.

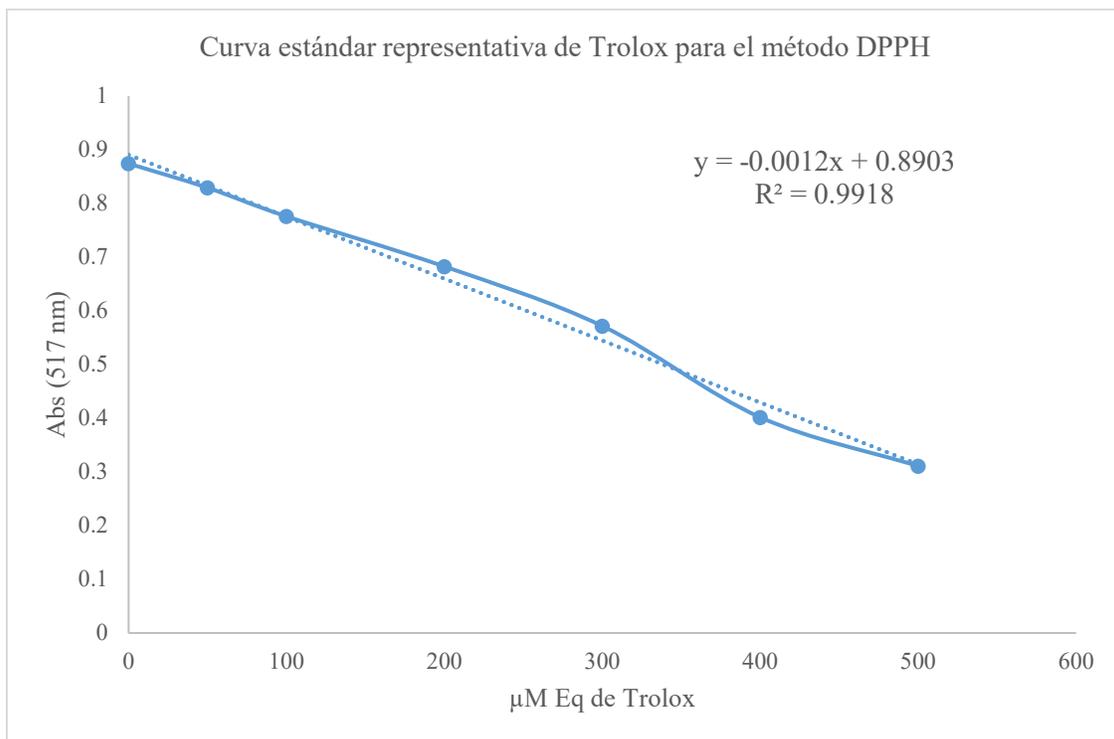
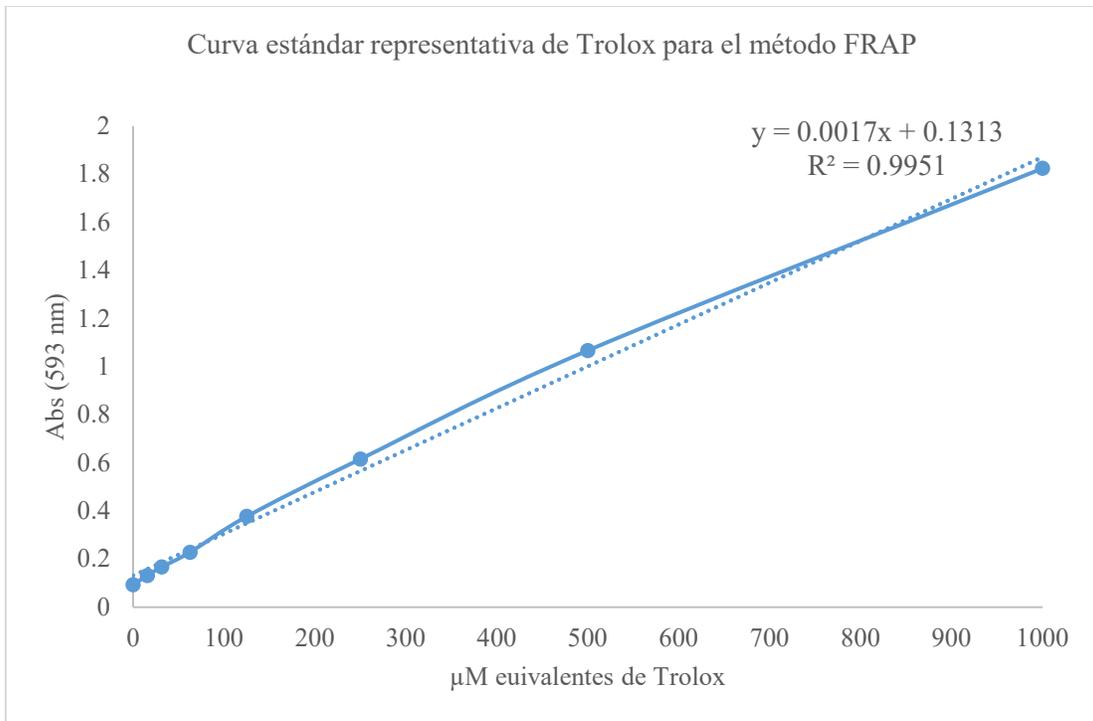
Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.

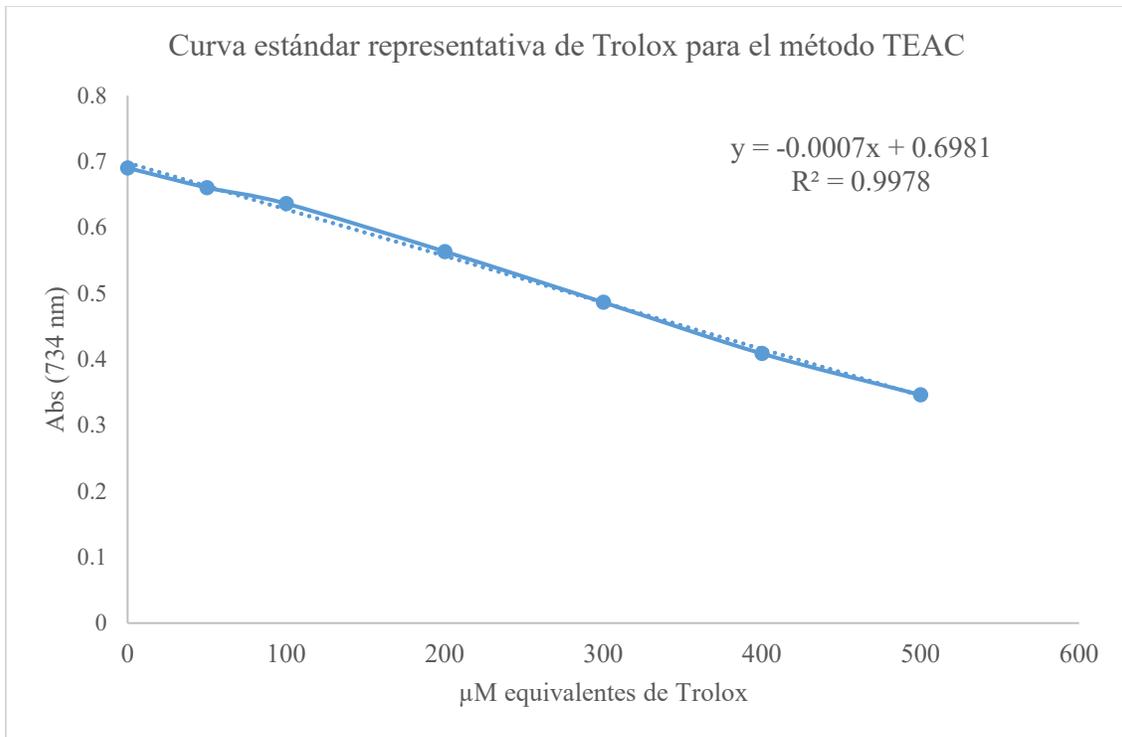
## 11. ANEXOS

### 11.1. Curva Estándar











## ***DC Protein Assay*** **Instruction** **Manual**

For Technical Service  
Call Your Local Bio-Rad Office or  
in the U.S. Call 1-800-4BIORAD  
(1-800-424-6723)

**BIO-RAD**

### **Table of Contents**

<b>Section 1</b>	<b>Introduction and Principle .....</b>	<b>1</b>
<b>Section 2</b>	<b>Product Description .....</b>	<b>1</b>
<b>Section 3</b>	<b>Materials Required but Not Supplied.....</b>	<b>1</b>
3.1	Safety Considerations .....	2
<b>Section 4</b>	<b>Reagent Compatibility .....</b>	<b>2</b>
<b>Section 5</b>	<b>Instructions .....</b>	<b>3</b>
5.1	Standard Assay Protocol .....	3
5.2	Microplate Assay Protocol .....	3
<b>Section 6</b>	<b>Response of Various Proteins .....</b>	<b>4</b>
<b>Section 7</b>	<b>Storage .....</b>	<b>4</b>
<b>Section 8</b>	<b>Troubleshooting Guide.....</b>	<b>5</b>
<b>Section 9</b>	<b>Ordering Information .....</b>	<b>6</b>
<b>Section 10</b>	<b>Related Materials .....</b>	<b>6</b>
<b>Section 11</b>	<b>References .....</b>	<b>7</b>
<b>Section 12</b>	<b>Safety Information .....</b>	<b>8</b>

## Section 1 Introduction and Principle

The Bio-Rad *DC* Protein Assay is a colorimetric assay for protein concentration following detergent solubilization. The reaction is similar to the well-documented Lowry<sup>1</sup> assay, but with the following improvements: The reaction reaches 90% of its maximum color development within 15 minutes thereby saving valuable time, and the color changes not more than 5% in 1 hour or 10% in 2 hours after the addition of reagents.

The assay is based on the reaction of protein with an alkaline copper tartrate solution and Folin reagent. As with the Lowry assay, there are two steps which lead to color development: The reaction between protein and copper in an alkaline medium, and the subsequent reduction of Folin reagent by the copper-treated protein.<sup>1</sup> Color development is primarily due to the amino acids tyrosine and tryptophan, and to a lesser extent, cystine, cysteine, and histidine.<sup>1,2</sup> Proteins effect a reduction of the Folin reagent by loss of 1, 2, or 3 oxygen atoms, thereby producing one or more of several possible reduced species which have a characteristic blue color with maximum absorbance at 750 nm and minimum absorbance at 405 nm.<sup>2</sup>

## Section 2 Product Description

Reagent package (catalog number 500-0116) includes:

- 250 ml REAGENT A, an alkaline copper tartrate solution
- 2000 ml REAGENT B, a dilute Folin Reagent
- 5 ml REAGENT S  
(Sufficient for 500 standard assays or 10,000 microplate assays)

The reagent package may be purchased as a kit with a bovine gamma globulin standard (kit catalog number 500-0111) or bovine serum albumin standard (kit catalog number 500-0112).

## Section 3 Materials Required but Not Supplied

For standard assay:

- 13 x 100 mm test tubes
- Reservoir for working reagent (size depends on amount of reagent that will be prepared)
- Pipets accurately delivering 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, and 4.0 ml
- Graduated cylinders or pipets for reagent preparation
- Spectrophotometer set to 750 nm

1

Vortex mixer

Plastic or glass cuvettes with 1 cm path length matched to laboratory spectrophotometer

Test tube rack to hold 13 x 100 mm test tubes

For microplate assay:

Microtiter plates

Reservoir for working reagent

Pipets for reagent preparation

Pipets accurately delivering 5  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, and 200  $\mu$ l

Microplate reader set to 750 nm

## 3.1 Safety Considerations

Eye protection and gloves should be worn while using this product. Consult MSDS at the end of this manual for additional information.

## Section 4 Reagent Compatibility

The listed compounds were tested and found to be compatible with the Bio-Rad *DC* Protein Assay. In some cases, the presence of one or more of these substances will effect a change in the response of the protein to the assay reagents; therefore, the standard should **always** be prepared in the same buffer as the sample.

10% SDS	1% CHAPS	2% NP-40
1% Triton <sup>†</sup> X-100	1% CHAPSO	1% Thesit <sup>†</sup>
1% Tween <sup>†</sup> 20	1% Octyl glucoside	1% Brij <sup>†</sup> -35
0.2% C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> <sup>*</sup>	0.1 M Tris, pH 8	0.5 M NaOH
0.5 M HCl	0.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 M EDTA
0.05 M CaCl <sub>2</sub>	0.4 M Guanidine HCl	4 M Urea
0.05% Sodium azide	1 mM DTT (dithiothreitol)	

Note: The DC Protein Assay is incompatible with 2-mercaptoethanol (BME)

<sup>†</sup> BRIJ and TWEEN are registered trademarks of Atlas Chemical. THESIT is a registered trademark of Desitin Arzneimittel GmbH. TRITON is a registered trademark of Rohm and Haas.

<sup>\*</sup>octaethyleneglycol dodecyl ether

2

## Section 5 Instructions

### 5.1 Standard Assay Protocol

#### 1. Preparation of working reagent

Add 20  $\mu$ l of reagent S to each ml of reagent A that will be needed for the run. (This **working reagent A'** is stable for one week even though a precipitate will form after one day. If precipitate forms, warm the solution and vortex. Do not pipet the undissolved precipitate, as this will likely plug the tip of the pipet, thereby altering the volume of reagent that is added to the sample.)

If samples do not contain detergent, you may omit step #1 and simply use reagent A as supplied.

2. Prepare 3 - 5 dilutions of a protein standard containing from 0.2 mg/ml to about 1.5 mg/ml protein. A standard curve should be prepared each time the assay is performed. *For best results, the standards should always be prepared in the same buffer as the sample.*
3. Pipet 100  $\mu$ l of standards and samples into clean, dry test tubes.
4. Add 500  $\mu$ l of reagent A' or A (see note from step 1) into each test tube. Vortex.
5. Add 4.0 ml reagent B into each test tube and vortex immediately.
6. After 15 minutes, absorbances can be read at 750 nm. The absorbances will be stable at least 1 hour. (See Troubleshooting Guide for recommendation on using a wavelength other than 750 nm.)

### 5.2 Microplate Assay Protocol

#### 1. Preparation of working reagent

Add 20  $\mu$ l of reagent S to each ml of reagent A that will be needed for the run. (This **working reagent A'** is stable for 1 week even though a precipitate will form after 1 day. If precipitate forms, warm the solution and vortex. Do not pipet the undissolved precipitate, as this will likely plug the tip of the pipet, thereby altering the volume of reagent that is added to the sample.)

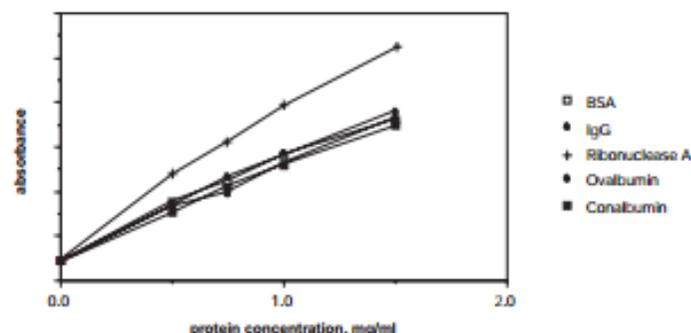
If samples do not contain detergent, you may omit step #1 and simply use reagent A as supplied.

2. Prepare 3 - 5 dilutions of a protein standard containing from 0.2 mg/ml to about 1.5 mg/ml protein. A standard curve should be prepared each time the assay is performed. *For best results, the standard should be prepared in the same buffer as the sample.*
3. Pipet 5  $\mu$ l of standards and samples into a clean, dry microtiter plate.

4. Add 25  $\mu$ l of reagent A' or reagent A (see note from step 1) into each well.
5. Add 200  $\mu$ l reagent B into each well. If microplate reader has a mixing function available, place plate in reader and let the plate mix for 5 seconds. If not, gently agitate the plate to mix the reagents. If bubbles form, pop them with a clean, dry pipet tip. Be careful to avoid cross-contamination of sample wells.
6. After 15 minutes, absorbances can be read at 750 nm. The absorbances will be stable for about 1 hour. (See Troubleshooting Guide for recommendation on using a wavelength other than 750 nm.)

## Section 6 Response of Various Proteins

As with any colorimetric assay, different proteins will elicit greater or lesser color formation. The following proteins have been assayed with the protein assay. As demonstrated by the graph, there is a slight variation in color development with different proteins.



## Section 7 Storage

Lyophilized preparations of Protein Standard I (bovine gamma globulin) and Protein Standard II (bovine serum albumin), if included, should be refrigerated upon arrival. These lyophilized preparations have a shelf life of one year at 4 °C. Rehydrated and stored at 4 °C, the protein solutions should be used within 60 days. Rehydrated and stored at -20 °C, the protein solutions should be used within 6 months.

REAGENT A, REAGENT B, and REAGENT S should be stored away from direct sunlight at room temperature (25-30 °C). (Reagents A and B may also be stored in the refrigerator.) All reagents are good for 6 months from date of purchase.

## Section 8 Troubleshooting Guide

1. The buffer that I normally use is not listed in the reagent compatibility list. How will I know if it interferes with the assay?  
It is best to run two standard curves: One with protein in the same buffer as your sample and one with protein in water and then plot a graph of protein concentration vs. absorbance. If the buffer does not interfere, the two graphs of the standard curve will have identical slope. Partial interference can be compensated for by adding the buffer or interfering component to the standard curve for the actual protein assay.
2. My sample is a mixture of proteins. Which standard should I use for the standard curve?  
In any protein assay, the best protein to use as a standard is a purified preparation of the protein being assayed. In the absence of such an absolute reference protein, one must select another protein as a relative standard. The best relative standard to use is one which gives a color yield similar to that of the protein being assayed.  
Any purified protein can be selected as a reference standard if only relative protein values are desired. Bio-Rad offers two standards: bovine gamma globulin (Standard I, catalog number 500-0005) and bovine serum albumin (Standard II, catalog number 500-0007).
3. Is any sample preparation required?  
In general, no. However, the protein must be solubilized. (The sample can not be a suspension or an unfiltered homogenate.)
4. May I use a wavelength other than 750 nm?  
Yes. Absorbance can be measured at 650-750 nm.
5. May I store the reagents in the refrigerator?  
Yes, but all components must be warmed to 25-30 °C prior to use. Reagent S will develop a precipitate during cold room storage. Warming to 37 °C for 5 minutes will dissolve the precipitate.

## Section 9 Ordering Information

Catalog Number	Product Description
500-0111	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Kit I</b> , includes contents of Reagents Package and bovine gamma globulin standard
500-0112	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Kit II</b> , includes contents of Reagents Package and bovine serum albumin standard
500-0116	<b>Bio-Rad DC Protein Assay Reagents Package</b> , does not include a standard

## Section 10 Related Materials

Catalog Number	Product Description
500-0001	<b>Bio-Rad Protein Assay Kit I</b> , 450 ml dye reagent concentrate and bovine gamma globulin standard for general use, based on Bradford method
500-0002	<b>Bio-Rad Protein Assay Kit II</b> , 450 ml dye reagent concentrate and bovine serum albumin standard for general use, based on Bradford method
500-0006	<b>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</b> , 450 ml dye reagent concentrate supplied without a standard, based on Bradford method
500-0005	<b>Protein Standard I</b> , bovine gamma globulin
500-0007	<b>Protein Standard II</b> , bovine serum albumin
223-9950	<b>Disposable Polystyrene Cuvettes</b> , 100 -3.5 ml cuvettes
224-0096	<b>Costar 96 Well Flat Bottom EIA Plate</b> , polystyrene microtiter plates, 5 per package, carton of 100
170-6601	<b>Model 3550 Microplate Reader</b> , 100/120 VAC
170-6602	<b>Model 3550 Microplate Reader</b> , 220/240 VAC
170-6621	<b>Model 450 Microplate Reader</b> , 100/120 VAC
170-6622	<b>Model 450 Microplate Reader</b> , 220/240 VAC

For information on Bio-Rad's extensive Microplate Data Analysis Systems, please call 800/4-BIORAD in the U.S., or contact your local Bio-Rad Representative.

## Section 11 References

1. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, **193** (1951): 265-275.
2. Peterson, Gary L., "Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall," *Analytical Biochemistry*, **100** (1979): 201-220.

## Section 12 Material Safety Data Sheets

### I. PRODUCT IDENTIFICATION

**TRADE NAME:** DC PROTEIN ASSAY REAGENT A

**Catalog No.:** Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

**Chemical identity, Common names:** SODIUM HYDROXIDE, Caustic soda, lye.

**Formula:** NaOH, a caustic.

**M.W.:** 40.00

**MANUFACTURER'S NAME:**

BIO-RAD LABORATORIES  
LIFE SCIENCE GROUP  
2000 ALFRED NOBEL DRIVE  
HERCULES, CA 94547

**EMERGENCY PHONE No.:**  
510/232-7000

**DATE PREPARED OR REVISED:** 2/3/95

**NAME OF PREPARER:** ROY WOOD

### II. HAZARDOUS INGREDIENTS

<u>CHEMICAL NAMES</u>	<u>CAS NUMBERS</u>	<u>PERCENT</u>	<u>EXPOSURE LIMITS IN AIR</u>		
			<u>ACGIH TLV</u>	<u>OSHA PEL</u>	<u>OTHER</u>
Sodium Hydroxide	1310-73-2	1-5%*	—	2 mg/m <sup>3</sup>	—

\*Aqueous solution also containing less than 1% sodium tartrate and less than .1% copper sulfate.

### III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

**BOILING POINT:** 100 °C

**SPECIFIC GRAVITY(H<sub>2</sub>O = 1):** 1

**VAPOR PRESSURE:** N/A

**MELTING POINT:** N/A

**VAPOR DENSITY(AIR = 1):** N/A

**EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1):** N/A

**SOLUBILITY IN WATER:** Infinite.

**APPEARANCE AND COLOR:** Pale blue liquid.

### IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

**FLASH POINT:** N/A

**FLAMMABLE LIMITS:** N/A

**(METHOD USED):** N/A

**EXTINGUISHING MEDIA:** Not required. Use media suitable for surrounding materials.

**SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES:** In the event of a fire, wear full protective clothing and NIOSH-approved self-contained breathing apparatus with full facepiece operated in the pressure demand or other positive pressure mode.

**UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS:** None expected .

## V. HEALTH HAZARD INFORMATION

### SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE (for each potential route of exposure):

**INHALED:** Corrosive! Inhalation not likely due to nature of the product. If product dries out, the inhaled sodium hydroxide dust may be fatal as a result of spasm, inflammation and edema of the larynx and bronchi, chemical pneumonitis and pulmonary edema.

**CONTACT WITH SKIN OR EYES:** Corrosive! Extremely destructive to tissue of the skin and eyes. May cause irritation of eyes and with greater exposures, severe burns with possibility of blindness resulting.

**ABSORBED THROUGH SKIN:** Corrosive! Destructive to skin on contact can cause irritation or severe burns and scarring with greater exposures.

**SWALLOWED:** Corrosive! DANGER: May be fatal if swallowed. Causes severe burns. Sodium hydroxide is classified as a poison under Federal Caustic Poison Act.

### HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

**ACUTE:** Corrosive! Causes severe burns. See above.

**CHRONIC:** Prolonged contact with dilute solutions or dust has a destructive effect upon tissue.

### FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

**EYE CONTACT:** Flush with large amounts of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get immediate medical attention.

**SKIN CONTACT:** Flush skin with large amounts of water for at least 15 minutes, while removing contaminated clothing and shoes. Wash clothes before reuse. Get medical attention.

**INHALED:** Remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Get immediate medical attention.

**SWALLOWED:** DO NOT INDUCE VOMITING! Give large quantities of water or milk if available. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention immediately.

### SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES:  FEDERAL OSHA  NTP  IARC

**MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE:** Persons with pre-existing skin disorders or eye problems or impaired respiratory function may be more susceptible to the effects of this substance.

## VI. REACTIVITY DATA

STABLE

UNSTABLE

CONDITIONS TO AVOID: NA

**INCOMPATIBILITY(Materials to avoid):** Strong acid solutions, organic halogen compounds, and nitromethane.

**HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS:** Sodium oxide.

**HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR:**  WILL NOT OCCUR

CONDITIONS TO AVOID: N/A

## VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

**SPILL RESPONSE PROCEDURES:** CAUTION: Caustic material. Cover spill with adsorbent and collect for solid waste disposal.

**PREPARING WASTES FOR DISPOSAL:** Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting, waste handling, and waste disposal.

## VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

**VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS:** In general, dilution ventilation is a satisfactory health hazard control for this substance.

**RESPIRATORY CONTROLS:** This product is a liquid and does not contain volatile organics and should not require any special respiratory controls. Respiratory controls may be required for protection against other chemicals being used in the same area.

**EYE PROTECTION:** Use chemical safety goggles. Contact lenses should not be worn when working with this material. Maintain eye wash fountain and quick-drench facilities in work area.

**GLOVES:** Chemical resistant gloves such as neoprene.

**OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT:** Lab coat or apron.

**WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES:** Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

**OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS:** Keep in a tightly closed container to protect product quality. Store in a cool, dry, ventilated area.

**PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:** Protective clothing, eyewear and appropriate NIOSH-approved respiratory protection should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

## I. PRODUCT IDENTIFICATION

**TRADE NAME:** DC PROTEIN ASSAY REAGENT B

**Catalog No.:** Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

**Chemical identity, Common names:** FOLIN REAGENT.

**Formula:** MIXTURE

**M.W.:** NA

**MANUFACTURER'S NAME:**

BIO-RAD LABORATORIES

LIFE SCIENCE GROUP

2000 ALFRED NOBEL DRIVE

HERCULES, CA 94547

**EMERGENCY PHONE No.:**

510/232-7000

**DATE PREPARED OR REVISED:** 2/3/95

**NAME OF PREPARER:**ROY WOOD

## II. HAZARDOUS INGREDIENTS

CHEMICAL NAMES	CAS NUMBERS	PERCENT	EXPOSURE LIMITS IN AIR	
			ACGIH TLV	OSHA PEL
REAGENT B is a diluted FOLIN reagent containing less than 1% each of the following ingredients:				
Lithium Sulfate	10377-48-7		no data found	
Tungstic acid, sodium salt	10213-10-2		1 mg/m <sup>3</sup>	1 mg/m <sup>3</sup> (TWA)
Molybdic acid, sodium salt	10102-40-6		5 mg/m <sup>3</sup>	5 mg/m <sup>3</sup>
Hydrochloric acid	7647-01-0		7.5 mg/m <sup>3</sup>	7 mg/m <sup>3</sup>
Phosphoric acid	7664-38-2		1 mg/m <sup>3</sup>	1 mg/m <sup>3</sup>

## III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

**BOILING POINT:** 100 °C (water)

**SPECIFIC GRAVITY**(H<sub>2</sub>O = 1): 1

**VAPOR PRESSURE:** NA

**MELTING POINT:** NA

**VAPOR DENSITY**(AIR = 1): NA

**EVAPORATION RATE** (BUTYL ACETATE = 1): NA

**ODOR:** odorless

**SOLUBILITY IN WATER:** infinite

**APPEARANCE AND COLOR:** Clear liquid.

## IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

**FLASH POINT:** NA

**FLAMMABLE LIMITS:** NA

**(METHOD USED):** NA

**EXTINGUISHING MEDIA:** Nothing special required. Use media suitable for surrounding materials.

**SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES:** For surrounding fire wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent contact with skin and eyes.

**UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS:** No special hazards known.

## V. HEALTH HAZARD INFORMATION

**SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE** (for each potential route of exposure):

**INHALED:** Not expected due to nature of product.

**CONTACT WITH SKIN OR EYES:** Would be irritating to eyes.

**ABSORBED THROUGH SKIN:** Could be mildly irritating to skin.

**SWALLOWED:** Large doses may cause gastrointestinal distress.

### HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

**ACUTE:** Contains dilute acids. Could be a mild irritant. The concentration of all the ingredients are less than 1% each. There is no specific information available for diluted FOLIN reagent. The diluted solution does contain dilute acids and heavy metals: SAX, 5th Ed. lists Molybdenum as "slightly toxic" and tungsten is listed as somewhat more toxic than molybdenum but "does not constitute an important health hazard".

**CHRONIC:** To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated for FOLIN reagent.

### FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

**EYE CONTACT:** Flush with large volumes of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

**SKIN CONTACT:** Remove any contaminated clothing. Wash skin with plenty of flowing water for at least 15 minutes. If irritation develops, get medical attention.

**INHALED:** Remove to fresh air. Get medical attention for any breathing difficulty.

**SWALLOWED:** Induce vomiting by giving two glasses of water, or milk if available and sticking finger down throat. Call a physician immediately. Never give anything by mouth to an unconscious person.

### SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES:  FEDERAL OSHA  NTP  IARC

### MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE:

No information found.

## VI. REACTIVITY DATA

**STABLE**

**UNSTABLE**

**CONDITIONS TO AVOID:** N/A

**INCOMPATIBILITY** (Materials to avoid): Strong oxidizers.

**HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS:** Upon dehydration oxides of phosphorous and hydrogen chloride gas may form.

**HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR**  WILL NOT OCCUR

**CONDITIONS TO AVOID:** N/A

## VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

**SPILL RESPONSE PROCEDURES:** Cover spill with a sorbent and collect for solid waste disposal.

**PREPARING WASTES FOR DISPOSAL:** Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting waste handling, and waste disposal.

## VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

**VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS:** In general, good ventilation is sufficient. However, if conditions of use create discomfort to the worker a local exhaust system should be considered.

**RESPIRATORY CONTROLS:** Should not be required for this product.

**EYE PROTECTION:** Chemical safety goggles.

**GLOVES:** Use chemical resistant gloves such as neoprene.

**OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT:** Wear lab coat or apron.

**WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES:** Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

**OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS:** Keep tightly sealed to protect quality. Store in a cool, dry, ventilated area.

**PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:**

Proper protective clothing, eye protection, and respiratory equipment should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.

## 1. PRODUCT IDENTIFICATION

**TRADE NAME:** DC PROTEIN ASSAY REAGENT S

**Catalog No.:** Used in Kits: 500-0111, 500-0112, and 500-0116

**Chemical identity, Common names:** Sodium dodecyl sulfate.

**Formula:** C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S

**M.W.:** 288.38

**MANUFACTURER'S NAME:**

**BIO-RAD LABORATORIES**

**LIFE SCIENCE GROUP**

**2000 ALFRED NOBEL DRIVE**

**HERCULES, CA 94547**

**EMERGENCY PHONE No.:**

**510/232-7000**

**DATE PREPARED OR REVISED:** 2/3/95

**NAME OF PREPARER:**ROY WOOD

## II. HAZARDOUS INGREDIENTS

<u>CHEMICAL NAMES</u>	<u>CAS NUMBERS</u>	<u>PERCENT</u>	<u>EXPOSURE LIMITS IN AIR</u>	<u>OTHER</u>
			<u>ACGIH TLV</u>	<u>OSHA PEL</u>
sodium dodecyl sulfate	151-21-3	5-10%†		no data found *

†Aqueous solution. Data given is for 100% SDS unless otherwise noted.

\*Orl-rat LD50: 1288 mg/kg

## III. PHYSICAL/CHEMICAL CHARACTERISTICS

**BOILING POINT:** 100 °C (water)

**SPECIFIC GRAVITY (H<sub>2</sub>O = 1):** N/A

**VAPOR PRESSURE:** N/A

**MELTING POINT:** 200 °C (362 °F) decomposes

**VAPOR DENSITY(AIR = 1):** N/A

**EVAPORATION RATE (BUTYL ACETATE = 1):** N/A

**ODOR:** Slight fatty odor

**SOLUBILITY IN WATER:** 0.1 g/ml

**APPEARANCE AND COLOR:** Clear liquid.

## IV. FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA

**FLASH POINT:** N/A

**FLAMMABLE LIMITS:** N/A

**(METHOD USED):** N/A

**EXTINGUISHING MEDIA:** Water spray, dry chemical, alcohol foam, or carbon dioxide.

**SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES:** As with most organic solids, fire is possible at elevated temperatures or by contact with an ignition source.

**UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS:** Fine dust dispersed in air in sufficient concentrations, and in the presence of an ignition source is a potential dust explosion hazard.

## V. HEALTH HAZARD INFORMATION

### SYMPTOMS OF OVEREXPOSURE (for each potential route of exposure):

**INHALED:** Not expected due to nature of product. However, if dried out the powder causes irritation of mucous membranes, throat and respiratory tract. Symptoms of sore throat, coughing, and choking can occur.

**CONTACT WITH SKIN OR EYES:** Irritating to eye tissue with redness and pain.

**ABSORBED THROUGH SKIN:** Mildly irritating to skin, causes a rash on continued exposure.

**SWALLOWED:** Large doses may cause gastrointestinal distress.

### HEALTH EFFECTS OR RISKS FROM EXPOSURE

**ACUTE:** See above.

**CHRONIC:** To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

### FIRST AID: EMERGENCY PROCEDURES

**EYE CONTACT:** Flush with large volumes of water for at least 15 minutes, lifting the upper and lower lids occasionally. Get medical attention.

**SKIN CONTACT:** Remove any contaminated clothing. Wash skin with plenty of flowing water for at least 15 minutes. If irritation develops, get medical attention.

**INHALED:** Remove to fresh air. Get medical attention for any breathing difficulty.

**SWALLOWED:** Induce vomiting by giving two glasses of water, or milk if available and sticking finger down throat. Call a physician immediately. Never give anything by mouth to an unconscious person.

### SUSPECTED CANCER AGENT

NO: THIS PRODUCT'S INGREDIENTS ARE NOT FOUND IN THE LISTS BELOW.

YES:  FEDERAL OSHA  NTP  IARC

### MEDICAL CONDITIONS AGGRAVATED BY EXPOSURE:

No information found.

## VI. REACTIVITY DATA

STABLE

UNSTABLE

CONDITIONS TO AVOID: N/A

INCOMPATIBILITY (Materials to avoid): Strong oxidizers.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: Oxides of sulfur and hydrogen sulfide.

HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR  WILL NOT OCCUR

CONDITIONS TO AVOID: N/A

## VII. SPILL, LEAK, AND DISPOSAL PROCEDURES

**SPILL RESPONSE PROCEDURES:** Caution, may be slippery. Small spill may be cleaned up with a sponge and water washed down the drain.

**PREPARING WASTES FOR DISPOSAL:** Comply with all applicable federal, state, and local regulations on spill reporting waste handling, and waste disposal.

## VIII. SPECIAL HANDLING INFORMATION

**VENTILATION AND ENGINEERING CONTROLS:** In general, good ventilation is sufficient.

However, if conditions of use create discomfort to the worker a local exhaust system should be considered.

**RESPIRATORY CONTROLS:** Should not be required for this product.

**EYE PROTECTION:** Chemical safety goggles.

**GLOVES:** Use chemical resistant gloves such as neoprene.

**OTHER CLOTHING AND EQUIPMENT:** Wear lab coat or apron.

**WORK PRACTICES, HYGIENIC PRACTICES:** Use good laboratory practices. Wash hands after using and before eating. Do not eat, drink, or smoke in the work area.

**OTHER HANDLING AND STORAGE REQUIREMENTS:** Keep tightly sealed to protect quality. Store in a cool, dry, well-ventilated place away from incompatible materials.

**PROTECTIVE MEASURES DURING MAINTENANCE OF CONTAMINATED EQUIPMENT:**

Proper protective clothing, eye protection, and respiratory equipment should be worn.

We believe that the information contained herein is current as of the date of this Material Safety Data Sheet. Since the use of this information and conditions of use of the product are not within the control of Bio-Rad, it is the user's responsibility to handle the product under conditions of safe use.