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

EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN HARINA DE SEMILLA DE RAMÓN (*Brosimum alicastrum*) FERMENTADA POR CEPAS ESPECÍFICAS DE *Lactococcus lactis* SOMETIDAS A DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

Por:

Olympia Judith Domínguez Murúa

TEIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Agosto 2021

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Olympia Judith Domínguez Murúa han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Dra. Belinda Vallejo Galland
Directora de tesis

Dra. Lilia Beltrán Barrientos
Integrante del comité de tesis

Dr. Adrián Hernández Mendoza
Integrante del comité de tesis

Dr. Aaron González Córdova
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Evaluación de la Potencial Actividad Biológica en Harina de Semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*)" 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 Olympia Judith Dominguez Murua, 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

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

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

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por abrirme las puertas y permitirme realizar mis estudios Maestría en Ciencias.

A Dios por su amor y sus bendiciones.

A mi directora de tesis Dra. Belinda Vallejo Galland y mis asesores Dra. Lilia María Beltrán Barrientos, Dr. Aarón Fernando González Córdova y Dr. Adrián Hernández Mendoza, por todo su apoyo y enseñanzas durante la realización de mi tesis.

Mis agradecimientos a la M.C. María del Carmen Estrada Montoya por el apoyo técnico recibido durante la realización de tesis.

A todos los integrantes de laboratorio de lácteos por todo su apoyo recibido durante la realización de mi tesis, en especial a la Dra. María de Jesús Torres Llanez, al M.C. Ricardo Reyes Díaz y la Dra. Lourdes Santiago López, así como todos los compañeros del laboratorio.

A mi esposo e hija, gracias por apoyo, amor y paciencia

A mis padres y mis hermanos por todo su amor y su apoyo.

CONTENIDO

APROBACIÓN……...……....2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL……..…….……3
AGRADECIMIENTOS…….……....4
CONTENIDO……..……...5
LISTA DE FIGURAS.....7
LISTA DE CUADROS.....8
RESUMEN.....9
ABSTRACT.....11
1. INTRODUCCIÓN.....12
2. ANTECEDENTES.....14
2.1. Alimentos Funcionales.....14
2.2. Péptidos Bioactivos (Origen Animal y Vegetal).....14
2.2.1. Métodos de Obtención de Péptidos Bioactivos.....16
2.2.1.1. Hidrólisis enzimática.....17
2.2.1.2. Hidrólisis ácida de proteínas.....17
2.2.1.3. Hidrólisis de proteína por fermentación microbiana.....17
2.2.1.4. Hidrólisis por digestión gastrointestinal.....18
2.2.2. Péptidos Antihipertensivos.....19
2.2.3. Péptidos Antioxidantes.....21
2.2.4. Péptidos Inhibidores de la Enzima Dipéptidil Peptidasa IV.....22
2.3. Pseudocereales.....23
2.3.1. Pseudocereales como Fuente de Péptidos Bioactivos.....24
2.4. Semilla del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*).....25
2.4.1. Producción.....26
2.4.2. Composición de la Semilla de Ramón.....26
2.4.3. Aplicaciones de la Semilla del árbol de Ramón.....27
3. HIPÓTESIS.....28
4. OBJETIVOS.....29
4.1. Objetivo General.....29
4.2. Objetivos Específicos.....29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....30
5.1. Reactivos.....30
5.2. Harina de Ramón.....30
5.3. Caracterización Fisicoquímica.....31
5.3.1. Cenizas.....31
5.3.2. Humedad.....31

CONTENIDO (continuación)

5.3.3. Grasa 32
5.3.4. Proteína 33
5.3.5. Hidratos de Carbono 34
5.4. Tratamiento de la Harina de Ramón 34
5.5. Cuantificación de Azúcares Totales en Harina Hidrolizada con α-amilasa 34
5.6. Microorganismos y Condiciones de Cultivo 35
5.7. Elaboración del Subcultivo de Harina de Semilla de Ramón 35
5.8. Fermentación de la Harina de Semilla de Ramón y Curvas de Crecimiento de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 36
5.9. Actividad Proteolítica de *Lacotoccus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en Harina de Semilla de Ramón Fermentada 36
5.10. Digestión Gastrointestinal Simulada 37
5.11. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina 38
5.12. Inhibición de Dipéptidil Peptidasa IV 40
5.13. Ensayo de Actividad Antitrombótica *in vitro* 40
5.14. Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ABTS 41
5.15. Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ORAC 42
5.16. Análisis Estadístico 43

6. RESULTADOS 44
6.1. Caracterización de Harina de Semilla de Ramón 44
6.2. Cuantificación de Azúcares Totales en Harina Hidrolizada con α-amilasa 45
6.3. Cinéticas de Crecimiento, pH y Actividad Proteolítica de *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en Harina de Semilla de Ramón 47
6.4. Digestión Gastrointestinal Simulada 53
6.5. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina 54
6.6. Actividad Antitrombótica 55
6.7. Inhibición de Dipéptidil Peptidasa IV 55
6.8. Actividad Antioxidante 56

7. CONCLUSIONES 60

8. ANEXOS 72

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fruto y semilla de Ramón……	26
2	Concentración de glucosa presente en la harina de semilla de Ramón (5%) después de haber sido sometida a tratamiento con α-amilasa……...	43
3	Curva de crecimiento del subcultivo de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y B-50572 en harina de semilla de Ramón durante 12 h a 30ºC……	44
4	Curva de crecimiento y cambios de pH de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 en harina de semilla de Ramón durante 48 h de fermentación a 30°C…	45
5	Curva de crecimiento y cambios de pH de *Lactococcus lactis* NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón durante 48 h de fermentación a 30°C…	46
6	Actividad proteolítica de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón a las 48 h de fermentación…….	49
7	Actividad proteolítica de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón a las 48 h de fermentación y sometidas a digestión gastrointestinal simulada……	50
8	Actividad antioxidante determinada mediante método ABTS para muestras de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada, antes y después de ser sometidas a simulación gastrointestinal…	54
9	Actividad antioxidante determinada mediante método ORAC para muestras de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada, antes y después de ser sometidas a simulación gastrointestinal…	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de semilla de Ramón……	26
2	Parámetros cinéticos de crecimiento de Lactococcus lactis NRRL B-50571 y NRRL B-50572 derivados de la ecuación de Gompertz en harina de semilla de Ramon…….	48
3	Porcentaje de inhibición de la ECA para harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada sometida a simulación gastrointestinal……..	52
4	Porcentaje de inhibición de la enzima DPP-IV para para harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada sometida a simulación gastrointestinal……	54

RESUMEN

La harina de semilla de Ramón (Brosimum alicastrum) (HSR) es un pseudocereal subexplotado y fue un importante alimento para la cultura Maya en el Período Clásico. HSR se caracteriza por contener un alto contenido de nutrimentos por lo que presenta potencial para ser incorporada como ingrediente en la producción de alimentos funcionales. Por otro lado, la producción de péptidos bioactivos derivados de las proteínas de HSR y liberados a través de la fermentación, presentan una estrategia novedosa para la producción de alimentos funcionales. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la potencial actividad biológica en HSR fermentada (HSRF) por Lactococcus lactis NRRL B-50571 (571) o NRRL B-50572 (572), antes y después de ser sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulado (DGS). Se caracterizó fisicoquímicamente la HSR y se preparó una suspensión de HSR en PBS (5%) con amilasa pancreática para liberar azúcares. Posteriormente, se preparó un subcultivo de HSR con L. lactis 571 o 572 al 1% y se fermentó por 5.5 h. Seguidamente, la suspensión de HSR, fue inoculada con el subcultivo (3%) y se incubó por 48 h a 30ºC. Durante la fermentación, se determinó el pH, la actividad proteolítica y UFC/mL. Se determinaron las actividades inhibidora de la enzima convertidora en angiotensina (IECA), antitrombótica, inhibición de la enzima dipéptidil peptidasa IV (DPP-IV) y antioxidante (ORAC y ABTS) de la HSRF, antes y después de la DGS. Los resultados mostraron un contenido de carbohidratos, proteína, humedad, cenizas, y grasa en HSR de 77.0±0.0, 10.1±0.051, 7.15±0.25, 4.03±0.28 y 1.55±0.07%, respectivamente. Después de 48 h, el pH disminuyó hasta 4.27±0.021 y 4.24±0.028 para 571 y 572, respectivamente;. y la actividad proteolítica no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre ellas. Asimismo, se encontró IECA en las HSRF; sin embargo no se observó efecto después de la DGS. Por el contrario, se encontró inhibición de la DPP-IV después de la DGS en las HSRF. Además, no se encontró actividad antitrombótica en las HSRF. Finalmente, se encontró actividad antioxidante por ABTS antes (20.98 y 28.34 µM Trolox) y después (20.64 y 34.33 µM Trolox) de la DGS para HSRF por 571 y 572; respectivamente. Adicionalmente, se encontró actividad antioxidante por ORAC de 125 y 236 µM Trolox para HSRF por 571 y 572; respectivamente, y esta incrementó significativamente ($p < 0.05$) a 1051 y 1433.5 µM Trolox, después de la DGS. En conclusión, la HSRF por L. lactis 571 o 572 presentó actividad biológica y pudiera ser utilizada como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras claves: *Brosimum alicastrum*, péptidos bioactivos, *Lactococcus lactis*, digestión gástrica simulada, fermentación microbiana.

ABSTRACT

Ramón seed flour (Brosimum alicastrum) (RSF) is an underexplored pseudocereal and an important food in Mayan culture during the Classic Period. Since it presents a high nutritional value; it may be used as a potential food ingredient for the development of functional foods. Moreover, the production of bioactive peptides from RSF through fermentation, may represent a novel strategy for the production of functional foods. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the potential biological effect of fermented RSF (FRSF) by Lactococcus lactis NRRL B50571 (571) or NRRL B-50572 (572) before and after simulated gastrointestinal digestion (SGD). RSF was characterized in terms of chemical composition and a 5% suspension of RSF in PBS was prepared with added pancreatic amylase in order to release sugars. Then, a preculture of RSF was prepared by inoculating with L. lactis 571 or 572 (1%) and were fermented for 48 h at 30ºC. After fermentation, pH, proteolytic activity and CFU/mL were determined. Moreover, angiotensin converting enzyme inhibition (ACEI), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibition, antithrombotic and antioxidant (ABTS and ORAC) activities of FRSF by L. lactis 571 or 572, before and after SGD were evaluated. After RSF characterization results showed that 77.0±0.0, 10.1±0.051, 7.15±0.25, 4.03±0.28 and 1.55±0.07 % were for carbohydrates, protein, moisture, ash and fat content; respectively. After 48 h of fermentation, pH decreased to 4.27±0.021 and 4.24±0.028 for 571 and 572, respectively; and there were no significant differences between fermented RSF for proteolytic activity. Additionally, ACEI was observed for FRSF; however, after SGD no effect was detected. Contrary to this, after SGD, DPP-IV inhibition was found in FRSF. Moreover, no antithrombotic activity was shown. Finally, antioxidant activity with ABTS was exhibited before (125 and 236 µM Trolox) and after (20.64 y 34.33 µM Trolox) SGD for FRSF by 571 and 572; respectively. Additionally, ORAC antioxidant activity was 125 y 236 µM Trolox for FRSF by 571 and 572, respectively; also, after SGD, ORAC antioxidant activity significantly increased to 1051 y 1433.5 µM Trolox for FRSF by 571 and 572, respectively. In conclusion, FRSF by L. lactis 571 and 572 presented biological activity and may be used as an ingredient for the development of functional foods.

Key words: *Brosimum alicastrum*, bioactive peptides, *Lactococcus lactis*, simulated gastric digestion, microbial fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades predominantes en la actualidad, particularmente las enfermedades degenerativas, tales como las cardiovasculares y diabetes, así como el cáncer, están relacionadas con la dieta diaria (Juárez y Perote, 2010). Por lo anterior, el interés del consumidor por la relación entre la dieta y la salud ha aumentado la demanda del desarrollo de alimentos que además de nutrir, tengan un beneficio adicional a la salud, éstos son llamados alimentos funcionales. Los rápidos avances en ciencia y tecnología, el aumento de los costos de los servicios de atención médica, una población cada vez más cercana a la vejez y el crecido interés en lograr un bienestar saludable a través de la dieta, son también factores que incrementan el interés por nuevas fuentes de alimentos funcionales (Vidal-Carou, 2008).

Dentro de los componentes fundamentales de los alimentos se encuentran las proteínas, las cuales sirven como fuente de energía y aminoácidos, los cuales contribuyen al crecimiento y mantenimiento del cuerpo (Shahidi y Zhong, 2008), además, este tipo de macronutrientes pueden funcionar como ingredientes funcionales. Varias de las propiedades fisiológicas y funcionales de las proteínas se atribuyen a péptidos biológicamente activos que a menudo se encuentran en la secuencia primaria de las proteínas (Minervini y Rizzello, 2007). Estos péptidos presentan de 3 a 20 unidades de aminoácidos, aunque en algunos casos el tamaño es mayor, y pueden ejercer diversas actividades reguladoras en el organismo humano (Mulero Cánovas *et al.*, 2011). Diferentes estrategias se han utilizado para la producción de péptidos, tales como el empleo de enzimas proteolíticas específicas (digestivas o microbianas), o bien el uso de bacterias proteolíticas en el proceso de fermentación (Toldrá *et al*., 2018).

En este último aspecto, ha resaltado la fermentación realizada con bacterias ácido lácticas (BAL), ya que además de ser utilizada ampliamente para la elaboración de productos con propiedades sensoriales agradables, también ha demostrado presentar beneficios a la salud. Se han reportado numerosos estudios sobre péptidos bioactivos derivados de proteínas animales, tales como las caseínas, las cuales han demostrado su alto potencial funcional (Rizzello *et al*., 2016). Sin embargo, el gran interés en el estudio de péptidos bioactivos procedentes de matrices vegetales ha incrementado; debido a su mayor sostenibilidad con respecto a los alimentos de origen animal y al

aumento de las necesidades del consumidor por dietas accesibles, saludables y equilibradas (Malaguti *et al*., 2014).

Estudios realizados sobre cereales, pseudocereales y cierto tipo de semillas, han demostrado que mediante su consumo ejercen beneficios a la salud a nivel metabólico, cardiovascular y gastrointestinal. Lo anterior, ha sido relacionado a la presencia de flavonoides, proteínas y una variedad de compuestos fitoquímicos (Navruz-Varli y Sanlier, 2016). Debido a esto, se han reportado diversos estudios realizados sobre péptidos bioactivos procedentes de matrices vegetales los cuales han sido obtenidos mediante distintos procesos de hidrólisis (García *et al*., 2013). En este sentido, podemos mencionar a la semilla del árbol de Ramón (*Brosimum Alicastrum*), la cual reporta un alto contenido de proteína y características estructurales, resultan de interés para el estudio de péptidos con potencial actividad biológica. Estudios recientes han demostrado que la semilla de Ramón presenta un perfil nutricional alto, de mayor calidad que el maíz. Esta semilla es considerada como un recurso natural subexplotado en México, la cual pudiera utilizarse para aumentar el valor nutricional de diversos alimentos (Subiria-Cueto *et al.,* 2019). Por todo lo anterior, el objetivo del presente estudio es determinar la potencial actividad biológica de péptidos obtenidos mediante la fermentación de harina de semilla de Ramón con BAL.

2. ANTECEDENTES

2.1. Alimentos Funcionales

Los cambios en el estilo de vida en las sociedades modernas han aumentado la prevalencia e incidencia de varios problemas de salud como enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad o cáncer. Los factores de riesgo relacionados con estas enfermedades podrían atenuarse o prevenirse a través de la dieta por lo cual, existe una demanda creciente de nuevos alimentos con mayor seguridad, valor nutricional y, sobre todo, saludables. Una de las líneas de investigación prioritarias en ciencia y tecnología de los alimentos se centra en el desarrollo de nuevos alimentos con ingredientes funcionales (Sarmiento-Rubiano, 2006).

Los alimentos funcionales y los componentes bioactivos en los alimentos son objeto de interés de investigadores y consumidores en general. Un alimento funcional es aquel que, además de aportar nutrientes, aportan efectos beneficiosos adicionales al organismo de manera que proporcionan un mejor estado de salud (Barazarte *et al*., 2015). Estos alimentos pueden ser añadidos de manera natural, modificarse o mejorarse, con el propósito de propiciar beneficios en la salud en cuanto a desarrollo, crecimiento temprano, defensa contra el estrés oxidativo, regulación de procesos metabólicos, fisiología cardiovascular y gastrointestinal, rendimiento mental, cognitivo, físico y deportivo (Tur y Bibiloni, 2015). Dentro de los alimentos funcionales hay elementos específicos o compuestos bioactivos, como prebióticos, probióticos, carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos, fitoestrógenos, ácidos grasos, lípidos estructurados o péptidos bioactivos, los cuales son los que confieren los beneficios adicionales a la salud (Boer *et al*., 2016).

2.2. Péptidos Bioactivos (Origen Animal y Vegetal)

Los péptidos bioactivos se encuentran originalmente en la secuencia primaria de las proteínas y pueden ser liberados por hidrólisis o procesos fermentativos. Estos presentan de 3 a 20 unidades

de aminoácidos, aunque en algunos casos, el tamaño puede ser mayor (Shahidi y Zhong, 2008). Estas secuencias aminoacídicas tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización. Así mismo, pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, memoria, dolor, apetito y los efectos de las vías de estrés sobre el sistema nervioso central, ejerciendo sus efectos a nivel local o en diversos órganos una vez que se han ingresado en el sistema circulatorio (Vermeirssen *et al*., 2004).

Debido a la gran relevancia que los péptidos bioactivos han presentado con respecto a la salud del ser humano, se han desarrollado diferentes técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Meisel, 2004). De esta manera, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos (Dziuba *et al*., 2005) siendo interesante destacar que, dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos son distintos (Wang *et al*., 2005).

Investigaciones reportadas sobre proteínas de origen vegetal de las que se han aislado péptidos bioactivos podemos mencionar los estudios realizados por Nogarta *et al*. (2009) en donde se descubrieron 6 péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que fueron producidos por reacciones de autólisis (por proteasas aspárticas) de subproductos de molienda de trigo. Haciendo uso de pepsinas, se obtuvo un péptido con fuerte actividad antioxidante (VECYGPNRPQF) a partir del desecho de proteína de algas *C. Vulgaris,* que normalmente son utilizadas como alimento para animales (Sheih y Wu, 2009). Por otro lado, al hidrolizar la proteína de endospermo de arroz con neutrasa, se lograron aislar dos péptidos diferentes que muestran fuertes actividades antioxidantes (Zhang *et al*., 2010). También se han obtenido péptidos antihipertensivos a partir de productos de soya (yogur de soya y salsa de soya) mediante fermentación con BAL (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) (Singh *et al*., 2014). Además, se ha demostrado que las leguminosas tropicales fermentadas (maní bambara, algarroba, soya) son capaces de reducir el estado de hipertensión, junto con la dislipidemia inducida por diabetes en ratas (Ademiluyi y Oboh, 2015).

Sabbione *et al*. (2016), evaluaron distintos protocolos de hidrólisis sobre aislados de proteína de amaranto para producir distintos polipéptidos y péptidos activos que generaron moléculas de baja e intermedia masa molecular con importantes diferencias estructurales respecto a sus proteínas nativas. Se observó que los tratamientos enzimáticos realizados sobre las proteínas nativas generaron péptidos con potencial actividad antitrombótica. En estudios más recientes Rivero-Pino *et al*. (2021), mediante el uso de proteasas comerciales (subtilisina y tripsina), evaluaron el potencial de inhibición de la enzima dipéptidil peptidasa IV (DPP-IV) de péptidos obtenidos a partir de siete tipos de proteínas vegetales (arveja, patata, garbanzo, lenteja, quinoa, altramuz y soya). Los hidrolizados se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y, a partir de las fracciones más bioactivas, se identificaron mediante espectrofotometría de masas a los péptidos responsables de esta bioactividad; siendo los de soya, lupino y quinoa los que presentaron la mayor bioactividad (Rivero-Pino *et al*., 2021).

2.2.1. Métodos de Obtención de Péptidos Bioactivos

El interés en el aprovechamiento de las proteínas ha desarrollado los procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la generación de concentrados y aislados proteicos. Sin embargo, estos aislados presentan dos grandes limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria como son su baja solubilidad y potencial alergenicidad. Estas razones, junto con la demanda de nuevos alimentos, ha conducido en los últimos años al desarrollo de procesos de hidrólisis enzimática de aislados proteicos vegetales. La esencia de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases), biológicos (con enzimas) o por procesamiento de alimentos como la fermentación (Gottschik, 1994). La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original.

2.2.1.1. Hidrólisis enzimática. Una de las estrategias más utilizadas para la obtención de péptidos bioactivos es por medio de hidrólisis enzimática (Yin *et al*., 2008). Se han utilizado con éxito enzimas de origen animal (tripsina y pepsina), vegetal (papaína y bromelina) y microbiano (alcalasa) solas o en combinación, para lograr una mayor degradación proteolítica (Quevedo *et al*., 2001). Para este método, es importante considerar diversos factores que pudieran influenciar en las actividades biológicas de los péptidos obtenidos. Principalmente, debe considerarse de gran importancia la selección de las enzimas apropiadas o la mezcla de ellas, ya que de ello depende obtener, de modo eficaz, los resultados esperados (Borja-Lozano, 2014).

En la producción enzimática de péptidos bioactivos se han empleado diversas enzimas de origen gastrointestinal, las más comunes son la pepsina y la tripsina. También se han utilizado combinaciones de enzimas, las cuales incluyen pancreatina y quimotripsina. A su vez, diversas enzimas obtenidas de cepas microbianas se han empleado con el objetivo de generar péptidos bioactivos (Ahn *et al*., 2012). Resulta ventajoso el empleo de proteasas derivadas de fuentes microbianas comerciales, por ejemplo, alcalasa, flavourzyma, neutrasa para degradar proteínas alimentarias, ya que dichas proteasas han logrado demostrar ser seguras y de bajo costo (Agyei y Danquah, 2011).

2.2.1.2. Hidrólisis ácida de proteínas. La hidrólisis ácida logra la degradación de las proteínas, en menor tiempo. En la hidrólisis ácida se fracciona la proteína, se rompen las cadenas polipeptídicas en desorden, en este proceso se genera una gran cantidad de sales y cloruros dañinos para las plantas. No obstante, el grado de hidrólisis que se obtiene es muy bajo (Vioque *et al*., 2001).

2.2.1.3. Hidrólisis de proteína por fermentación microbiana. La fermentación es la transformación de sustancias orgánicas en compuestos más simples como péptidos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados por la acción de enzimas derivadas de microorganismos. Los aminoácidos y péptidos liberados a través de la fermentación, son contribuyentes significativos al aroma y sabor de los productos fermentados (Raksakulthai y Haard, 1992). Así mismo, se han reportado péptidos con actividad biológica producidos durante la fermentación, siendo los más estudiados los lácteos (Tsai *et al*., 2008) y la soya y la colza (He *et al*., 2012). En este sentido, la

producción de péptidos obtenidos a partir de la fermentación microbiana con actividad biológica se ha convertido en una parte integral de la producción de alimentos saludables en varios países. Productos ya conocidos como el natto y el tempeh, productos derivados de la fermentación controlada de la soya con hongos, contienen péptidos con actividad antioxidante (Wongputtisin *et al*., 2007).

Se ha reportado que los géneros bacterianos *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis* propician la producción de péptidos con capacidad inhibidora de la ECA en leches fermentadas (Figueroa-Hernández *et al*., 2012). La presencia de varias peptidasas principales específicas en estos géneros indica que ambos géneros hacen uso de un sistema proteolítico similar (Sasaki, *et al*., 1995). Los componentes estructurales del sistema proteolítico de las BAL pueden ser divididos en tres grandes grupos de acuerdo a su función (Kunji *et al*., 1996):

- Proteinasas: Son las encargadas del rompimiento inicial de péptidos.
- Peptidasas: Degradan los péptidos formados por la acción de las proteinasas.
- Sistemas de transporte: trasladan los péptidos producidos hacia la membrana citoplasmática.

Este sistema implica proteinasas que se encuentran asociadas a la pared celular. Estas generan di, tri y tetrapeptidos, los cuales son internalizados mediante sistemas de transportes de oligopéptidos a través de la membrana citoplasmática y una vez que los oligopéptidos están en el interior de la célula, específicamente en el citoplasma, son degradados por peptidasas intracelulares. Esto da como resultado la formación de péptidos pequeños y aminoácidos libres (Savijoki *et al*., 2006).

2.2.1.4. Hidrólisis por digestión gastrointestinal. La digestión es la barrera potencial para que los péptidos puedan alcanzar los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Durante el proceso natural de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos o liberarlos del seno de su proteína de origen donde se encontraban inactivos, presentando propiedades especiales una vez liberados (Vermeirssen *et al*., 2004). La digestión de las proteínas se inicia en el estómago por acción de las pepsinas; sin embargo, además de la proteólisis en el estómago, la alta acidez del mismo hidroliza las proteínas antes de que estas alcancen el intestino para su absorción (Soltero *et al*., 2005). En el lumen intestinal, las endopeptidasas pancreáticas, principalmente la tripsina, elastasa y quimiotripsina

junto con exopeptidasas como la carboxipeptidasa, producen péptidos de dos a seis residuos aminoacídicos, así como aminoácidos libres, los cuales son absorbidos como tales atravesando el ribete estriado de los enterocitos con ayuda de transportadores o acarreadores (Arhewoh *et al*., 2005).

2.2.2. Péptidos Antihipertensivos

La hipertensión arterial (HTA) es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede dañarlos. La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos (arterias) al ser bombeada por el corazón. Cuanto más alta es la presión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear. La mayoría de las personas con hipertensión arterial no muestra ningún síntoma. No obstante, en ocasiones causa síntomas como dolor de cabeza, dificultad respiratoria, vértigos, dolor torácico, palpitaciones del corazón y hemorragias nasales. La HTA es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares, tales como infarto al miocardio, un ensanchamiento del corazón, una insuficiencia cardiaca, entre otras (OMS, 2013). Además, es considerada como la enfermedad crónica más frecuente a nivel mundial. En México, conforme se incrementa la edad, crece el porcentaje de población con diagnóstico previo de HTA, principalmente a partir de los 50 años, llegando al 26.7% en el grupo de 70 a 79 años en 2018 (ENSANUT, 2018).

El mecanismo antihipertensivo más estudiado para los péptidos bioactivos está mediado por a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El sistema renina-angiotensina-aldosterona desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del tono vascular frente a la resistencia periférica. La renina, producida a partir del aparato yuxtaglomerular de los riñones, degrada el angiotensinógeno para producir el decapéptido inactivo angiotensina I. Este último se degrada, por acción de la ECA, liberándose el potente vasoconstrictor angiotensina II. La angiotensina II también estimula la síntesis y liberación de aldosterona de la corteza suprarrenal, lo cual aumenta la presión sanguínea promoviendo la retención de sodio (y, por tanto, la retención de agua) en los túbulos distales (Ahnfelt-Ronne, 1991). La ECA actúa simultáneamente en el sistema quinina-calicreína catalizando la degradación del nanopéptido bradiquinina (Soffer, 1976),

lo cual teóricamente contribuye a los efectos hipertensivos de la actividad de la ECA (Ahnfelt Ronne, 1991).

La estrategia más común para seleccionar péptidos derivados de los alimentos con potencial actividad antihipertensiva, es la búsqueda de péptidos inhibitorios de la ECA. Las técnicas analíticas generalmente utilizadas para este efecto son la cromatografía líquida de alta resolución y métodos espectrofotométricos. Los estudios *in vitro* generalmente monitorean la conversión de un sustrato por la presencia de ECA o la ausencia de sus inhibidores. Esta actividad inhibitoria se expresa como IC_{50} (concentración necesaria para inhibir un 50% de la actividad enzimática) (Hernández-Ledesma *et al*., 2011).

Tovar-Pérez *et al*. (2015) determinaron la actividad inhibitoria de la ECA en un hidrolizado de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto con alcalasa. Las fracciones de péptidos de albúmina 1 y globulina, seleccionadas de la filtración en gel, presentaron valores de IC_{50} de 0.82 ± 0.05 mg/mL y de 0.32 ± 0.02 mg/mL; respectivamente. Lo anterior, son valores de que se encuentran dentro del rango observado para otros péptidos de otras fuentes alimentarias. Por otro lado, Wang *et al*. (2017) evaluaron la capacidad inhibidora de la ECA de hidrolizados de salvado de arroz obtenidos mediante el uso de la enzima tripsina. Los resultados mostraron un IC_{50} de 76 μM. Posteriormente, identificaron la secuencia de aminoácidos responsable de la actividad por medio de espectrofotometría de masas. Incluso, determinaron el acoplamiento molecular (molecular docking) de dicho péptido, y los resultados mostraron que la inhibición de la ECA del péptido es atribuida principalmente a la formación de fuertes enlaces de hidrógeno con los sitios activos de la ECA humana (Wang *et al*., 2017).

En estudios más recientes se ha evaluado el efecto antihipertensivo *in vitro* e *in vivo*, de péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteína del brócoli utilizando quimotripsina. Se aislaron e identificaron tres péptidos inhibidores de la ECA y se sometieron a digestión gastrointestinal, en donde se observó que estos mismos aumentaban el doble de su actividad después de la simulación. El efecto antihipertensivo fue evaluado mediante la administración oral en ratas espontáneamente hipertensas, en las cuales se demostró un significativo efecto antihipertensivo (Dang *et al*., 2019).

Por otro lado, el efecto antihipertensivo ha sido evaluado en subproductos, tales como la harina obtenida a partir de la producción de aceite de chía (Pablo-Osorio *et al*., 2019). Los aislados de proteína de chía se obtuvieron utilizando diferentes proteasas comerciales (alcalasa, pepsina, tripsina y quimotripsina) y se evaluó su potencial biológico mediante enfoques *in vitro* e *in silico*.

El hidrolizado de proteína utilizando pepsina, mostró el mayor potencial de inhibición de la ECA (IC_{50} de 0.128 ± 0.02 mg/ml) en comparación con otros péptidos y testigos positivos (Captopril y Lisinopril). Lo anterior, proporciona un valor agregado a este tipo de subproductos (Pablo-Osorio *et al*., 2019).

2.2.3. Péptidos Antioxidantes

La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS) o de nitrógeno (ERN o NOS) y otros radicales libres, son productos naturales del metabolismo celular (Sánchez *et al.*, 2013). Para mantener control sobre los radiales libres, EROS y ERN, el organismo cuenta con un complejo antioxidante basado en compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. No obstante, cuando el sistema de defensa antioxidante es sobrepasado por los radicales libres, inducen al organismo a un estrés oxidativo (Ortiz Escarza y Medina Lopez, 2020). Así mismo, debido a que estas especies son inestables, muestran una elevada reactividad que en muchos casos se manifiesta como simple reacción química que determina una secuencia de reacciones manifestadas como una agresión y posteriormente desarrollar una patología (Sánchez *et al.*, 2013).

Recientemente, el interés por los péptidos antioxidantes derivados de las proteínas alimentarias ha aumentado, de acuerdo con el papel reconocido en los mecanismos de prevención del estrés oxidativo asociado con numerosas enfermedades degenerativas del envejecimiento (Adebiyi *et al*., 2009). Los péptidos biológicamente activos con potencial actividad antioxidante se han obtenido de una amplia variedad de animales y plantas (Coda *et al*., 2012). Principalmente, de granos de cacao, granos de cacahuate, salvado de arroz, proteína de girasol, proteína de hoja de alfalfa, harina de gluten de maíz, piel de rana, ñame, proteína de yema de huevo, kéfir de leche y kéfir de bebida de soya, champiñones, caballa, hojas de curry, gusano de hoja de algodón, caseína, desechos de proteínas de algas, trigo y trigo sarraceno (Sarmadi y Ismail, 2010). Estos péptidos antioxidantes, actúan como inhibidores de la peroxidación lipídica, se presentan como eliminadores directos de radicales libres y/o como agentes para quelar iones de metales de transición que catalizan la generación de especies radicales (Shimada *et al*., 1992).

Coda *et al*. (2012), fermentaron con BAL diversas harinas de cereales, pseudocereales y legumbres.

Los resultados mostraron actividad antioxidante significativamente mayor a la de los controles no fermentados, presentando mayor actividad en la proteína de harina de trigo integral y de centeno. Los péptidos de dichas harinas mostraron actividad antioxidante en un modelo *ex vivo* comparable a la del α-tocoferol en fibroblastos de ratón sometidos artificialmente a estrés oxidativo. Se han reportado péptidos con actividad antioxidante liberados por *Oenococcus oeni*, B. *subtilis*, *Bacillus pumilus* y *L. plantarum* durante el mosto de uva (Apud *et al*., 2013), fermentación de semilla de linaza (He *et al*., 2012) proteína de arroz (Dei *et al*., 2014) y soya (Singh *et al*., 2014); respectivamente. También se reportaron evidencias *in vitro* e *in vivo* de las actividades antioxidantes de péptidos aislados de douchi (alimento chino tradicional de soya fermentada con sal) (Wang *et al*., 2008) y semillas de cacao semifermentadas (Preza *et al*., 2010). Por otro lado, Vanvi y Tsopmo (2016), reportaron que la proteína de salvado de avena, hidrolizada con pepsina, mostró poder de eliminación de radicales peróxilo (608 ± 17 μM Equivalentes de Trolox/g de proteína). Así mismo, Bagul *et al*. (2018), determinaron la actividad antioxidante en semillas de tamarindo hidrolizados con papaína. Los hidrolizados derivados de las semillas de tamarindo, mostraron una actividad de 178.83 μM Equivalentes de Trolox/mg de proteína el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 66.94 μM Equivalentes de Trolox/mg de proteína mediante el ensayo de ácido 2,2'-azino-bis-(3- etillbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS) y 94.71 μM Equivalente de Trolox/mg de proteína mediante el ensayo FRAP, demostrando valores superiores en comparación con valores reportados para semillas de sandía y col forrajera (Bagul *et al*., 2018).

2.2.4. Péptidos Inhibidores de la Enzima Dipéptidil Peptidasa IV

La enzima dipéptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una proteína integral de membrana (tipo II) altamente glicosilada y multifuncional que desempeña papeles importantes en el metabolismo de numerosos péptidos bioactivos, entre los que se encuentran hormonas neuroendocrinas, citoquinas y quimosinas (Gorrell, 2005). Se ha demostrado que la actividad enzimática de DPP-IV escinde una variedad de péptidos biológicos en ensayos *in vitro*, como el péptido similar a la hormona peptídica glucagón (GLP-1) y el péptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP) (Arnold *et al*., 2018).

Estudios *in silico* han reportado la presencia de péptidos inhibidores de la DPP-IV en péptidos de diversas proteínas como las del suero de leche (Tulipano *et al*., 2015), caseínas de la leche bovino, colágeno de la carne de bovinos y colágeno del salmón (Lacroix y Li-Chan, 2013), salvado de arroz (Hatanaka *et al*., 2012), atún (Huang *et al*., 2011), amaranto (Velarde-Salcedo *et al*., 2013), gelatina de piel porcina (Huang *et al*., 2014) y frijol (Mojica y González de Mejia, 2016). Incluso, se han explorado diversas proteasas con la finalidad de producir péptidos con la capacidad de inhibir a la DPP-IV. En este sentido estudios recientes con hidrolizados de colágeno de piel de salmón evaluaron sobre la inhibición *in vitro* de la DPP-IV. Éste fue hidrolizado individualmente con diferentes enzimas (*e.g.* pepsina, tripsina, papaína o alcalasa). El hidrolizado procedente de la proteína del salmón, obtenido con tripsina fue el que presentó la mayor inhibición de la DPP-IV (Ritian *et al*., 2020).

Por otro lado, proteinasas grado alimenticio tales como la alcalasa, derivadas de microorganismos, así como enzimas obtenidas a partir de animales (pepsina y tripsina) y plantas (papaína, proteasa de calabaza), también han sido estudiadas (Reyes Bautista, 2017). Incluso, estudios con modelos de digestión gastrointestinal simulado han reportado la producción de péptidos capaces de inhibir la actividad de DPP-IV; lo que sugiere que los péptidos inhibidores de DPP-IV pueden generarse *in vivo* durante el proceso de digestión (Lacroix y Li-Chan, 2013).

2.3. Pseudocereales

Los pseudocereales son un grupo de especies vegetales no gramíneas que no pertenecen a la familia de los cereales, pero presentan propiedades y usos similares (Fletcher, 2016). Éstos son plantas dicotiledóneas productoras de semillas que se consumen como granos. Generalmente, no contienen gluten y son ricos en proteínas y nutrientes (Morales *et al*., 2020). Los estudios reportados sobre el valor nutrimental de los pseudocereales muestran que son fuentes ricas en carbohidratos (principalmente almidón y fibra dietética), proteínas con alto valor nutritivo y excelentes niveles de aminoácidos esenciales (lisina, metionina y triptófano). Así mismo, contienen lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, alto contenido de vitaminas y minerales, así como la presencia de compuestos potencialmente bioactivos (Machado *et al*., 2015).

2.3.1 Pseudocereales como Fuente de Péptidos Bioactivos

Hoy en día la búsqueda de nuevas fuentes alimentarias impulsa a reconsiderar el valor nutricional de los pseudocereales (Morales *et al*., 2020). Además de su función nutricional, se ha descubierto que las proteínas de los pseudocereales ejercen propiedades biológicas por sí mismas y/o como fuente de péptidos bioactivos. Varios estudios han demostrado las propiedades bioactivas de los hidrolizados y péptidos de proteína de quinoa. Aluko y Monu (2003), realizaron hidrólisis enzimática de proteína de quinoa con alcalasa, obteniendo hidrolizados con actividad antioxidante y antihipertensiva. Montoya-Rodríguez *et al*. (2014), sometieron harina de amaranto a un proceso de digestión gástrica *in vitro*, obteniendo como resultado, hidrolizados con capacidad inhibidora de la ECA y capacidad para reducir citocinas proinflamatorias en la línea celular THP-1 en humano y ratón.

Por otra parte, Vilcacundo *et al*. (2017), evaluaron la influencia de la digestión gastrointestinal de la proteína de quinoa para la liberación de péptidos con potencial antidiabético. Después de someter la proteína de quinoa, a incubación secuencial con pepsina y pancreatina, se obtuvieron péptidos inhibidores de las enzimas DPP-IV, α-amilasa y α-glucosidasa, las cuales están involucradas con la velocidad de digestión de los carbohidratos y el transporte de glucosa en sangre. Los péptidos liberados durante la fase duodenal, en particular las fracciones de péptidos menores a 5 kDa, fueron los que mostraron mayor efecto inhibidor. En otros estudios, Mudgil *et al*. (2019), utilizaron enzimas proteolíticas (bromelina, quimotripsina y proteasa) para obtener hidrolizados de proteína de amaranto y quinoa, con actividad antioxidante frente a radicales ABTS y DPPH. En general se observó que los hidrolizados producidos por quimotripsina en un tiempo de 6 h, generaron valores de actividad antioxidante significativamente más altos.

En estudios recientes se determinó la capacidad anticancerígena *in vitro* de hidrolizados de proteína de amaranto obtenidos por digestión gástrica simulada. Los hidrolizados mostraron capacidad anticancerígena *in vitro*, en células humanas de cáncer de mama triplemente negativas, con un valor de IC_{50} de 48,3 ± 0,2 µg/mL (Taniya *et al*., 2020). Por otro lado, Cotabarren *et al*. (2019) determinaron actividad antioxidante en hidrolizados obtenidos a partir del subproducto del proceso de extrusión de las semillas de chía. El tratamiento realizado con papaína, mostró un enriquecimiento de péptidos con bajo peso molecular (< 3kDa y < 15 kDa) los cuales presentaron

diferencias significativas en los valores de IC_{50} frente a la eliminación de los radicales DPPH y ABTS (Cotabarren *et al*., 2019).

Tomando en cuenta el potencial que presentan los pseudocereales como fuente de péptidos bioactivos, resulta de interés el explorar este tipo de matrices alimentarias, de las cuales se ha demostrado mediante diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, su potencial nutraceútico, ya sea como alimento o ingrediente funcional.

2.4. Semilla del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*)

Recientemente, el consumo de pseudocereales ha incrementado debido a sus efectos benéficos para la salud. Éstos son plantas dicotiledóneas productoras de semillas que se consumen como granos. Generalmente, no contienen gluten y son ricos en proteínas y nutrientes (Morales *et al*., 2020). Los pseudocereales más cultivados y estudiados son la quinua (*Chenopodium* quinoa), el amaranto (*Amaranthus* spp.), la chía (*Salvia hispánica*) y el alforfón (*Fagopyrum* spp.) (Morales *et al*., 2020). Sin embargo, existen otro tipo de plantas no convencionales de origen neotropical, las cuales comparten estas mismas características y por lo tanto considerados como pseudocereales neotropicales (Piatti *et al*., 2019).

En este sentido podemos mencionar a la semilla del árbol de Capomo (*Brosimum alicastrum*), también conocido como árbol de Ramón, el cual es una especie endémica de Mesoamérica, esta especie es dominante en las selvas de México y Centroamérica hasta Perú y las Islas Caribe, es adaptable a condiciones desfavorables para otro tipo de cultivos y puede prosperar en sitios con humedad y regiones áridas (Vega-López *et al*., 2003). Según el reporte *Brosimum alicastrum* GRAS (2007), la especie ha sido utilizada por los humanos, convirtiendo el fruto, la semilla, la madera, las hojas y el látex, en fuentes de materias primas para alimentación y forrajes. En la actualidad su utilización es limitada puesto que su fama es mínima, pero estudios recientes han demostrado que las semillas de Ramón, presentan un perfil nutricional alto; incluso, de mayor calidad que el maíz (Subiria-Cueto, 2019).

2.4.1. Producción

Los árboles de esta especie alcanzan su etapa productiva a los 5 años (Peters y Prado-Tejeda, 1982). Un árbol puede producir de 50 a 75 kg de fruto al año, de los que se pueden obtener de 16 a 29 kg de semilla seca, y en cada kilogramo encontrar de 300 a 350 semillas (Cordero *et al*., 2003). Tejada y Muñoz (1980), reportaron períodos de fructificación y floración del Ramón en diversos estados de México. En el estado de Yucatán, Ortíz y Herrera (2009), informaron que la floración se presenta entre los meses de noviembre y febrero, y la fructificación la mayor parte del año, siendo más abundante en los meses de enero, abril, mayo, junio y septiembre.

2.4.2. Composición de la Semilla de Ramón

El árbol de Ramón produce un fruto con sabor dulce que envuelve una semilla también conocida como nuez maya, semilla de Ramón o de capomo. Cada fruto contiene una semilla de 1.5 a 2 cm de diámetro cubierta de una testa papirácea amarillenta, con los cotiledones montados uno sobre el otro de sabor dulce (Figura 1).

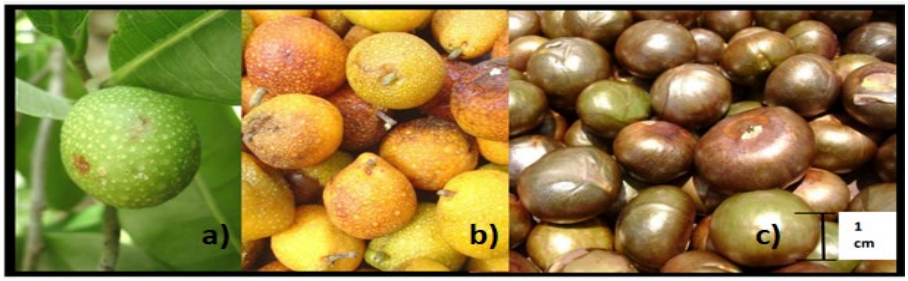


Figura 1. Fruto y semilla de Ramón. a) Fruto inmaduro, b) frutos maduros, c) semillas de Ramón. (Tomado de Morales & Herrera, 2009).

Diversos estudios reportan que la cantidad de carbohidratos presentes en la semilla de Ramón es de alrededor del 75% del peso seco de la semilla, siendo más del 61% almidón, por lo que es el

principal componente de la semilla. De igual forma destaca su alto contenido de proteína, ácido fólico, minerales, fibra, triptófano, y vitaminas A y C (Meiners *et al*., 2009). De acuerdo con Larque-Saveedra (2014), la calidad de la harina elaborada con estas semillas es alta, comparable o mejor que la de gramíneas convencionales, gracias a su concentración de proteínas, carbohidratos y grasas. En el Cuadro 1 muestra los componentes principales de la semilla del árbol de Ramón.

Cuadro 1. Composición de harina de semilla de Ramón.

	Fuente			
Componente	Barquera (2014)	Peters y Prado-Tejeda (1982)	Lozano (1978)	Arevalo y Bressani (2013)
Carbohidratos (%)	72.25	ND	77.27	72.8
Proteína (%)	12.24	12.8	10.87	10.52
Fibra (%)	4.96	4.6	5.99	3.4
Lípidos (%)	1.1	ND	ND	ND
Humedad (%)	5.88	ND	ND	8.33

ND: No determinado.

2.4.3. Aplicaciones de la Semilla del árbol de Ramón

Algunas de las aplicaciones atribuidas al uso de la semilla de Ramón, se centran en su contenido de compuestos fenólicos y su buen nivel de aceptación en cuestiones de sabor y nutrición (Zárate *et al*., 2019). Estudios han reportado que la semilla de Ramón contiene ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido caféico y ácido p-cumárico) que va de 6.5 a 326 μg/g, siendo el ácido p-hidroxibenzoico el principal compuesto fenólico (Ozer, 2017).

A pesar del conocimiento ancestral y de ser una especie con propiedades de interés nutrimental y potencialmente funcionales, *Brosimum alicastrum* ha sido subutilizado. Recientemente, el interés que se ha presentado en la semilla de Ramón se enfoca principalmente en su contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Hernández-González *et al*., 2014). Por todo lo anterior, la harina de semilla de Ramón es una matriz vegetal subexplorada; por lo que resulta de interés determinar si esta presenta actividad biológica después de haber sido fermentada por BAL, lo cual le proporcionaría un valor agregado a este producto.

3. HIPÓTESIS

La harina de semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) fermentada con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 presenta potencial actividad biológica después de haber sido sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la potencial actividad biológica presente en harina de semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) fermentada por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

4.2 Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de fermentación de la harina de semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572.
2. Evaluar la actividad proteolítica de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) fermentada.
3. Evaluar la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina de los extractos obtenidos < 3 kDa de harina de semilla de Ramón antes y después de haber sido sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.
4. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos < 3 kDa de harina de semilla de Ramón antes y después de haber sido sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.
5. Evaluar la inhibición de dipeptidil peptidasa IV de los extractos obtenidos < 3 kDa de harina de semilla de Ramón antes y después de haber sido sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.
6. Evaluar la actividad antitrombotica de los extractos obtenidos < 3 kDa de harina de semilla de Ramón antes y después de haber sido sometida a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los reactivos que se utilizaron en la presente investigación fueron: Caldo M17, peptona y dextrosa de la marca DIFCO (Sparks, MD, USA.). Hidróxido de sodio (NaOH) y ácido sulfúrico de la marca Favela Pro S.A. DE C.V. (Mocorito, Sin., Méx.). Indicador rojo de metilo de la marca MERCK (Darmstadt, Hessen, DEU.). ácido bórico, etanol, ácido clorhídrico (HCl), cloruro de calcio ($CaCl_2$), ácido tricloroacético (TCA), fenol, D-(+)-glucosa (glucosa), L-leucina (leucina), cloruro de potasio (KCl), solución amortiguadora de fosfato salino (PBS), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de sodio ($NaCl_2$), ácido acético, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH), ácido 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS), fluoresceína, amilasa porcina (EC: 3.2.1.1), pancreatina porcina, bilis deshidratada y purificada, pepsina porcina (EC: 3.4.23.1), enzima convertidora de angiotensina de pulmón de conejo (EC: 3.4.15.1) (ECA), hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL), dipéptidil peptidasa IV (EC: 3.4.14.5) (DPP-IV), sustrato DPP-IV (G-P-AMC), trombina de plasma humano (EC: 3.4.21.5), fibrinógeno humano, provenientes de Sigma Chemical (St. Louis, M.O., E.E.U.U..), y los reactivos O-phthaldialdehído (OPA) y acetonitrilo de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, M.A., E.E.U.U.).

5.2 Harina de Ramón

La harina de semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) utilizada en el presente estudio fue obtenida de la empresa KISHUR (Chocholá, Yucatán, Méx.) y almacenada a temperatura ambiente (24 ºC) hasta su posterior procesamiento y análisis.

5.3. Caracterización Fisicoquímica

Se realizó la caracterización fisicoquímica de la harina de semilla de Ramón siguiendo los lineamientos de la AOAC (2000). Las pruebas realizadas fueron cenizas, humedad, grasa y proteína. El contenido de hidratos de carbono fue calculado por diferencia. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.3.1. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó mediante el método de calcinación directa por triplicado. Se pesó 1 g de muestra de harina de Ramón y se colocó en un crisol a peso constante. La muestra fue precalcinada lentamente en una placa de calentamiento, y después se calcinó en una mufla Thermo Fisher Scientific F30438CM (Waltham, MA, E.E.U.U.), a 500°C por 5 h. Posteriormente, se colocó el crisol en desecador a peso constante por 20 min y se registró el peso. La determinación del porcentaje de cenizas se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{W1 - W2}{W}\ x\ 100$$

Donde W1 es el peso del crisol con la muestra calcinada, W2 es el peso del crisol solo y W es el peso de la muestra.

5.3.2. Humedad

La determinación de humedad se realizó mediante la pérdida de peso por calentamiento en estufa

por triplicado. Se pesó 3 g de harina de Ramón y se colocó en crisoles ajustados a peso constante, se registró el peso del crisol con muestra húmeda y posteriormente se colocaron los crisoles con muestra en estufa (VWR Sheldon 1350 GM, OR, E.E.U.U.) a temperatura de 100 °C por 4 h. Después se enfriaron en desecador por 20 min y se registró el peso nuevamente. Los crisoles se colocaron 30 min en estufa y 20 min en desecador. Este procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante de las muestras. Los cálculos para el porcentaje de humedad se realizaron con la siguiente formula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M1 - M2}{M} \; x\, 100$$

Donde M1 es el peso del crisol más la muestra húmeda, M2 es el peso del crisol más la muestra seca y M es el peso de la muestra.

5.3.3. Grasa

La determinación de grasa se realizó mediante el método Soxhlet. Se pesó 1.5 g de harina de Ramón en papel filtro Whatman No. 2 (tamaño de poro 8 μm) y fue colocado en un cartucho de extracción. Se utilizó un matraz con 50 mL de éter de petróleo y se realizó el proceso de extracción por 6 h. Al finalizar la extracción se eliminó el solvente por evaporación (Centrivap concentrator LABCONCO, MO, E.E.U.U.). Posteriormente, el matraz con la muestra de grasa se llevó a secado en estufa a 100°C por 1 h; finalmente, se colocó en peso constante en el desecador y se registró el peso. El porcentaje de grasa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{M1 - M2}{M} \; x\, 100$$

Donde M1 es el peso del matraz sin muestra, M2 es el peso del matraz con grasa y M es el peso de la muestra.

5.3.4. Proteína

Para la determinación de proteína se utilizó el método Micro-Kjeldhal. Se pesaron 200 g de muestra desgrasada y se depositaron en un matraz de digestión, después se adicionó 1.5 g de mezcla catalizadora preparada con 5 g de $CuSO_4$ y 93 g de Na_2SO_4 y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Los matraces se colocaron en digestor Micro-Kjeldhal (Rapid distillation unit LABCONCO, EE. UU) y se aumentó la temperatura paulatinamente. Una vez que la muestra fuera completamente digerida (solución translúcida), fue colocada en un destilador para Micro-Kjeldhal y se neutralizó utilizando 20 mL de NaOH al 40%. Se colocó un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 15 mL de ácido bórico al 4% (p/v) y 3 gotas de indicador (0.125 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol) para la recepción de la muestra destilada. Finalmente, las muestras se titularon con HCl (0.1 N). Para el porcentaje de proteína se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{V * N * 0.014}{M}\ x\ 100$$

Donde V son los mililitros de HCl gastados en la titulación, N es la normalidad de la solución de HCl, M es el peso en gramos de la muestra y 0.014 es el equivalente de nitrógeno.
Para el cálculo del porcentaje de proteína se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Proteína (\%)} = \text{\% de nitrógeno} * \text{FC}$$

Donde FC es el factor de conversión (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1975).
FC = 6.25

5.3.5 Hidratos de Carbono

La cantidad de carbohidratos totales presentes en la harina de Ramón se determinó por diferencia. El cálculo se realizó restando los porcentajes de humedad, proteínas, grasas y ceniza de 100% para obtener el porcentaje.

5.4. Tratamiento de la Harina de Ramón

El pretratamiento aplicado a la harina de Ramón fue realizado con base en la metodología reportada por Olguin Maciel (2015), con algunas modificaciones. Se prepararon suspensiones al 5% (p/v) de harina de Ramón en PBS (0.1 M, 6.0 ± 0.02), aplicando agitación con magneto durante 15 min. Posteriormente, se adicionó a cada muestra 60 mg/L de Ca^{+2} en forma de cloruro de calcio y 1.203 g de α-amilasa porcina, equivalentes a 19250 unidades de enzima requerida para hidrolizar 19.25 g de almidón presente en la suspensión de harina. Ambos reactivos fueron disueltos en PBS 0.1 M. Posteriormente, la harina fue incubada a 30 °C por 1 h con agitación constante, en un agitador orbital con temperatura controlada (Shaker Bath Lab Line, MA, EE.UU.). Finalizando la incubación se aplicó tratamiento térmico (121°C, 15 min) en una autoclave (Yamato SM510, Tokio, JPN). Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25°C).

5.5. Cuantificación de Azúcares Totales en Harina Hidrolizada con α-amilasa

Para la cuantificación de azúcares totales liberados en la harina de semilla de Ramón hidrolizada con α-amilasa y tratada con tratamiento térmico, se utilizó el método colorimétrico fenol-sulfúrico descrito por DuBois *et al*. (1956) con modificaciones. Se tomaron muestras de 5 mL y se centrifugaron a 4696 *xg* por 45 min a 4°C. Posteriormente, a 1 mL del sobrenadante se agregó 1 mL de solución de fenol al 5% y de manera inmediata se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico

concentrado. Se dejó reposar las muestras por 10 min seguido de 30 s de agitación empleando un agitador mecánico (VWR® Analog Vortex MixerTM, West Chester, PA, EE.UU.). Seguidamente, se reposaron en baño de agua a temperatura ambiente (25 ºC) por 20 min. Finalmente, se realizó medición de absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm (Olguin Maciel, 2015). La concentración se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de glucosa de 5 puntos como mínimo (1.25 - 0.039 mg/mL).

5.6. Microorganismos y Condiciones de Cultivo

Las cepas de *Lactococcus lactis* NRRLB-50571 y NRRLB-50572 aisladas de lácteos artesanales (Gutiérrez-Mendez *et al*., 2008), pertenecen a la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.), Unidad Hermosillo, Sonora. Las cepas fueron inoculadas (1% v/v) en caldo M17 (DIFCO, Sparks, MD, E.E.U.U.) adicionado con dextrosa (10% p/v, DIFCO, Sparks, MD, USA) estéril e incubadas durante 18 h a 30 ° C. Posteriormente, fueron subcultivadas durante 4 h, recuperadas por centrifugación (3600 *xg*, 4 ºC por 10 min), y lavadas con una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, 0.1 M, pH 6.0 ± 0.02). Los paquetes celulares obtenidos fueron resuspendidos en PBS hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.5 (*c.a.* 10^8 UFC/mL) utilizando un espectrofotómetro multimodal Spectramax M3 (Sunnyvale, CA, E.E.U.U.) (Mendoza Salazar, 2020).

5.7. Elaboración del Subcultivo de Harina de Semilla de Ramón

Se preparó una suspensión de harina de semilla de Ramón al 5% (p/v) con PBS 0.1 M, pH 6.0 ± 0.02, y se le aplicó el tratamiento descrito anteriormente (Sección 5.4). Después, las suspensiones fueron inoculadas (1% v/v) con el último subcultivo en caldo M17 (4 h) de *Lactococcus lactis* NRRLB-50571 y NRRLB-50572. El subcultivo fue incubado por 5.5 h a 30 °C con agitación constante.

5.8. Fermentación de la Harina de Semilla de Ramón y Curvas de Crecimiento de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572

A una suspensión al 5% (p/v) de harina de semilla de Ramón en PBS 0.1 M, pH 6.0 ± 0.02, se aplicaron los tratamientos mencionados anteriormente (Sección 5.4) y se pasó a inocular al 3% (v/v) con el subcultivo de harina de semilla de Ramón (Sección 5.7), se incubó por 48 h a 30 °C con agitación constante. Una vez finalizada la fermentación, las muestras fueron almacenadas a -20ºC hasta su posterior análisis. Para el testigo (harina de semilla de Ramón sin fermentar), se elaboró siguiendo la metodología descrita en la Sección 5.4.

El cambio de pH se registró cada 6 h (Olguin Maciel, 2015). Así mismo, el crecimiento de ambas cepas *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en la harina de semilla de Ramón se determinó utilizando el método de vaciado en placa (Hoben y Somasegaran, 1982). Se tomó 1 mL de muestra durante el proceso de fermentación en los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42 y 48 h y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada. Posteriormente, se tomaron 200 µL las diluciones 4, 5 y 6 y se adicionaron en placas preparadas con agar granulado y M17 (Difco) empleando la técnica de estriado y se incubaron a 30 ºC por 48 h. Al finalizar el periodo de incubación, todas las colonias visibles fueron contadas y los resultados fueron expresados como UFC mL^{-1}.

5.9. Actividad Proteolítica de *Lacotoccus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en Harina de semilla de Ramón Fermentada

La actividad proteolítica de *Lacotoccus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en la harina de semilla de Ramón fermentada se determinó mediante la liberación de grupos NH_3 siguiendo el método o-phthalaldehido (OPA) descrito por Church *et al*. (1983). La determinación se realizó en las muestras de harina de semilla de Ramón fermentadas y no fermentada (testigo) a las 0 y 48 h. Se mezcló una alícuota de 5 mL de cada muestra con 1 mL de agua milli-Q y 10 mL de TCA (0.75 %), se aplicó agitación durante 1 min y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente, las muestras

fueron centrifugadas (4696 *xg*, 45 min, 4°C) y los sobrenadantes obtenidos se filtraron con papel Whatman No. 2 (tamaño de poro de 8 µm).

Para la cuantificación de grupos NH_3 se utilizó una microplaca de 96 pozos (Corning ^{TM}, NY, E.E.U.U.). Se agregó una alícuota de muestra de 20 µL del sobrenadante a 200 µL de solución de reactivo OPA de fluoraldehído (ThermoScientific, Rockford, IL, EE.UU.). Después de 2 min a 20 °C, se realizó la medición de fluorescencia a una excitación de 360 nm y una emisión de 455 nm en lector de microplacas (SpectraMax, M3, Sunnyvale, CA., EE. UU.). La actividad proteolítica se expresó como mg/mL de L-leucina liberada durante la fermentación de la harina. Se utilizó una curva estándar de L-leucina (0-500 µg/mL) y cada medición se realizó por triplicado (Anexo 8.1). El valor obtenido de mg/mL de L-leucina para el testigo fue restado a los valores de las harinas de semilla de Ramón fermentadas.

5.10. Modelo de Digestión Gastrointestinal Simulada

La digestión gastrointestinal simulada de la harina de semilla de Ramón fermentada, no fermentada y agua (testigo de la digestión) se realizó siguiendo el método descrito por Minekus *et al*. (2014) con ligeras modificaciones. De manera seriada, se llevaron a cabo las fases oral, gástrica y del intestino delgado. Las muestras se mantuvieron en agitación constante a 37 °C durante todo el proceso, empleando un agitador orbital con temperatura controlada.

Para la fase oral a 3 g de muestra fermentada (48 h), no fermentada o 3 mL de agua destilada se agregaron 2.10 mL de solución electrolítica salival simulada (KCl 15.1 mM, KH_2PO_4 3.7 mM, $NaHCO_3$ 13.6 mM, $MgCl_2$ 0.15 mM y $(NH_4)_2CO_3$ 0.06 mM) con un pH ajustado de 7.0 utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments; Woonsocket, RI, E.E.U.U.), seguido de 300 µL de una solución de α-amilasa (1500 U/mL) y 15 µL de $CaCl_2$ (300 mM). Después se agregaron 585 µL de agua milli-Q y se dejó pasar un tiempo de 2 min para continuar con la fase gástrica.

Para la fase gástrica en condiciones de ayuno, la suspensión oral fue mezclada con 4.5 mL de solución electrolítica gástrica simulada (KCl 6.9 mM, KH_2PO_4 0.9 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, NaCl 47.2 mM, $MgCl_2$ 0.1 mM y $(NH_4)_2CO_3$ 0.5 mM) junto con 960 µL de una solución de pepsina (25000 U/mL), 3 µL de $CaCl_2$ (300 mM). Después se agregaron 120 µL de HCl (1.0 M) para llevar

la mezcla a un pH de 3 (al finalizar la fase gástrica se aseguró que el pH de la mezcla se mantuviera en un valor de 3, de no ser así, se realizó un ajuste con HCl 1.0 M) y finalmente se adicionaron 417 µL de agua milli-Q. La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C con agitación constante.

Al finalizar el tiempo, se llevó a cabo la fase del intestino delgado en el cual se adicionaron 6.6 mL de solución intestinal simulada (6.8 mM KCl, 0.8 mM KH_2PO_4, 85 mM $NaHCO_3$, 38.4 mM NaCl and 0.33 mM $MgCl_2$) junto con 3 mL de una solución de pancreatina (800 U/mL), 1.5 mL de una solución de bilis (160 mM), 24 µL de $CaCl_2$ (300 mM), 90 µL de NaOH (1 M) para que la solución alcanzara un pH de 7.0 y 486 µL de agua milli-Q. Las mezclas se mantuvieron en incubación por 2 h a 37 °C con agitación constante. Para finalizar la digestión e inactivar las enzimas, las muestras fueron calentadas a 100 °C por 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Al finalizar el proceso de digestión, los hidrolizados fueron centrifugados (4174 *xg*, 30 min a 4°C) y los sobrenadantes obtenidos y la actividad proteolítica se determinó como lo descrito en la sección. 5.9.

Finalmente, los extractos acuosos < 3 kDa se obtuvieron con base en la metodología descrita por Vermeulen *et al*. (2006). Las muestras de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 o NRRL B-50572, la harina de semilla de Ramón no fermentada, así como las muestras digeridas de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 o NRRL B-50572 y la harina de semilla de Ramón no fermentada fueron centrifugadas (4696 *xg*, 45 min, 4°C). Posteriormente, el sobrenadante fue ultrafiltrado utilizando una membrana de corte de 3 kDa (Amicon) para obtener los extractos < 3 kDa. Los extractos acuosos ultrafiltrados resultantes fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis de actividades biológicas *in vitro* (inhibición de la ECA, inhibición de la DPP-IV, antioxidante y antitrombótico).

5.11. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina

Para el ensayo de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se siguió el método descrito por Wu *et al*. (2002). Los extractos < 3 kDa obtenidos de las harinas de semilla de Ramón fermentadas y no fermentada, antes y después de ser digeridas fueron diluidas (1:1) en buffer de boratos (100 mM) con NaCl (300 mM) con un pH ajustado de 8.3. Se mezclaron 50 µL

de Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) 2.17 mM con 10 µL de la muestra de extractos < 3 kDa y se dejó en incubación a 37 °C por 10 min con agitación constante (38 *xg*) en un Eppendorf-Thermomixer R Mixer (Framingham, MA., USA). Después a cada mezcla se adicionó 10 µL de ECA 0.1 U/mL (preincubada a 37 °C por 10 min) y se pusieron en incubación por 30 min a 37 °C en agitación constante (38 *xg*). Pasando el tiempo de incubación se detuvo la reacción con la adición de 85 µL de HCl 1 M.

La liberación de ácido hipúrico durante la reacción de determinó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) (Agilent serie 1260, Agilent Technologies, Alemania) con una columna ZORBAX Eclipse Plus C_{18} (4.6 x 100 nm, 3.5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, E.E. U.U.) con detección a 228 nm (arreglo de diodos DAD). La fase móvil consistió en un solvente A: Agua desionizada y ácido trifluoroacético (1000:0.5) y solvente B: acetonitrilo con ácido trifluoroacético (1000:0.5). La detección del ácido hipúrico se realizó utilizando un gradiente de elución (5-60 %; Solvente B en A) con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, 2 min con el solvente B a 60% y posteriormente una reducción en gradiente de 60% a 5% en un min y manteniendo a 5% B por 4 min; detectándose en 11.24 min de tiempo de retención. Adicionalmente, se inyectó HHL bajo las mismas condiciones, detectándose en el tiempo de retención 12.6 min. El % de inhibición de la actividad de la ECA se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de inhibicion ECA (\%)} = \frac{A-B}{A} x\ 100$$

A: Corresponde al área de ácido hipúrico resultante durante la reacción del sustrato y la enzima (ECA).

B: Corresponde al área del ácido hipúrico resultante de la reacción del sustrato y la enzima en presencia del inhibidor.

5.12. Inhibición de Dipéptidil Peptidasa IV

La inhibición de dipéptidil peptidasa IV (DPP-IV) por los extractos < 3 kDa obtenidos de las harinas de semilla de Ramón fermentadas y no fermentada, antes y después de ser digeridas fue determinada siguiendo el método de Kuranov *et al*. (2018) con ligeras modificaciones. DPP-IV (0.02 U/mL) y el sustrato Gly-Pro-p-nitroanilida (1.59 mM) fueron preparados con solución amortiguadora de ensayo Tris-HCl 100 mM a pH 8. En una microplaca de 96 pozos, se mezcló 25 µL de muestra (extractos < 3 kDa) y 25 µL de sustrato Gly-Pro-p-nitroanilida, y se incubaron a 37 ºC por 10 min. Posteriormente, 50 µL de enzima DPP-IV fue adicionada y se incubó a 37 ºC por 60 min, y la reacción se detuvo con solución amortiguadora de acetato (1 M, pH 4). La absorbancia a una longitud de onda de 405 nm se leyó en utilizando un lector de microplacas (SpectraMax, M3, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

La actividad inhibitoria fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Pocentaje de inhibicion } (\%) = 1 - \frac{(A - \text{B})}{(C - D)}\ x\ 100$$

A) Testigo muestra = sustrato + muestra + solución amortiguadora
B) Muestra = sustrato + muestra + enzima DPP-IV
C) Testigo positivo = sustrato + enzima DPP-IV + solución amortiguadora
D) Testigo negativo = sustrato + solución amortiguadora + solución amortiguadora

5.13. Ensayo de Actividad Antitrombótica *in vitro*

La determinación de la actividad antitrombótica de los extractos < 3 kDa obtenidos de las harinas de semilla de Ramón fermentadas y no fermentada, antes y después de ser digeridas se realizó de

acuerdo a la metodología descrita por Yang *et al*. (2007), con algunas modificaciones. El cual determina la inhibición de la enzima trombina que cataliza la conversión de fibrinógeno en cadenas de fibrina y por lo tanto se encuentran ligados a la producción de trombos.

El ensayo se llevó acabo utilizando una microplaca de 96 pozos, en donde se colocaron 140 µL de fibrinógeno 0.1% (p/v) disuelto en buffer de tris-HCl 0.05 M a pH 7.2 con NaCl (0.12 mM) y 40 µL de la muestra de extractos < 3 kDa, tomando el buffer de Tris-HCl como blanco, después se incubó la mezcla a 37 °C por 10 min y se tomó la primera lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 405 nm. Posteriormente, se agregó a la misma mezcla 10 µL de trombina (12 U/mL), se dejó incubar la reacción a 37 °C por 10 min y se tomó la segunda lectura de la absorbancia a 405 nm.

El porcentaje se inhibición de la actividad de la enzima se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Pocentaje de inhibicion } (\%) = 1 - \frac{(A - B) - (C - \mathrm{D})}{(A - B)}\ x\ 100$$

A) Muestra = sustrato fibrinógeno + muestra + enzima trombina
B) Testigo muestra = sustrato fibrinógeno + muestra + solución amortiguadora
C) Testigo positivo = sustrato fibrinógeno + enzima trombina + solución amortiguadora
D) Testigo negativo = sustrato fibrinógeno + solución amortiguadora + solución amortiguadora

5.14. Capacidad Antioxidante mediante el Ensayo ABTS

La actividad antioxidante de los extractos acuosos fue determinada siguiendo la metodología propuesta por Re *et al*. (1999), antes y después de la simulación gastrointestinal. El método consiste en producir en oscuridad el radical ácido 2,2'–azino–bis–(3–etillbenzotiazolin–6–sulfonico

(ABTS), mediante la solución ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (1:0.5, v/v). Se mezcló y se sometió a incubación en oscuridad durante 16 h a 30 °C. Una vez formado el radical, este fue diluido con PBS (0.05 mM, pH 7.2) hasta obtener una DO_{734nm} de 0.7 ± 0.02. Posteriormente, se tomaron 10 µL del extracto de la muestra < 3 kDa y se le adicionaron 200 µL de la solución diluida del ABTS. Finalmente, a los 7 min se realizaron las lecturas de la mezcla a 734 nm en un espectrofotómetro multimodal (SpectraMax, M3, Sunnyvale, CA, EE. UU.), cada una por triplicado. Se construyó previamente una curva estándar de 5 puntos, con 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) como patrón (0-500 µM) y el resultado se reportó como equivalentes de Trolox (Anexo 8.2.).

5.15. Capacidad Antioxidante mediante el Ensayo ORAC

La capacidad antioxidante por este método se determinó siguiendo la metodología establecida por Zulueta *et al*. (2009) con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en microplaca de 96 pozos, se mezclaron 50 µL de los extractos acuosos < 3 kDa con 50 µL de fluoresceína (78 mM) utilizando PBS (50 mM, pH 7.2) como blanco. La mezcla fue incubada por 10 min a 37 °C y posteriormente se agregaron 25 µL del radical AAPH (221 mM) con micropipeta multicanal (Sartorius ™ Biohit ™ Proline ™ Plus Multichannel Mechanical Pipetter, EE.UU.). Inmediatamente, se incubacó a 37°C y se registró la fluorescencia (485 nm de excitación y 535 nm emisión) cada 5 min durante 5 h.

Posteriormente, los datos obtenidos fueron normalizados con respecto a la curva del blanco, multiplicando los datos originales por el valor de fluorescencia y se graficaron con respecto al tiempo con el fin de obtener el área bajo las curvas de decaimiento de la fluorescencia.

$$1 + = \sum_{i-1}^{n} fi/f0$$

Los valores de ORAC se refieren al área de protección neta de fluoresceína, donde e f_0 corresponde a la fluorescencia inicial a tiempo cero y f_i corresponde a la fluorescencia de cada uno de los tiempos que fueron evaluados. Los resultados se expresaron como Equivalentes Trolox, para lo cual se construyó una curva estándar de cinco puntos con Trolox como patrón (0-500 μM) (Anexo 8.3.).

5.16. Análisis Estadístico

Se buscó la normalidad de los datos por medio de estadística descriptiva y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un 95% de confianza para todas las variables. En el caso de existir diferencias entre las medias se analizaron por la prueba de Tukey-Kramer y se consideró significativo cuando $p<0.05$. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS versión 2020 (Kaysville, UT., USA.).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización Físicoquímica de Harina de Semilla de Ramón

La caracterización de la harina de semilla de Ramón consistió en la determinación de los componentes nutrimentales. Los resultados mostraron que el contenido de proteína, humedad, cenizas y grasa en la harina de semilla de Ramón fue de 10.1 ± 0.051, 7.15 ± 0.25, 4.03 ± 0.28 y 1.55 ± 0.07%; respectivamente. La humedad obtenida en la harina de semilla de Ramón (7.15 ± 0.25%), fue similar a lo reportado por Zamorano (2009) de 7.7%. No obstante, otros estudios han reportado mayor contenido de humedad (8.3%) (Arévalo y Bressani, 2013) y 10.95% (Mayan Nut Institute, 2007). Incluso, también se han reportado valores menores (6.5%) (FAO, 1993) que lo encontrado en el presente estudio. La cantidad de humedad en un alimento se encuentra intrínsecamente relacionado con la vida de anaquel; entre menor sea la cantidad de humedad, mayor será la vida de anaquel (Adebowale *et al*., 2012).

El contenido de ceniza (4.03 ± 0.28%) fue similar a los valores reportados por otros autores; tales como del 4% (Zamorano, 2009), 3.9% (Larqué-Saavedra, 2014) y 4.1% (Carter, 2015). Las cenizas es una medida total de minerales presentes en un alimento; y en el caso de semilla de harina de Ramón, ha sido reportado que contiene Cu, Zn, K, Fe y Na (Subiria-Cueto, 2019). Debido a que la semilla de Ramón es una fuente rica en hierro, no es necesario enriquecer la harina para cumplir con los requerimientos establecidos para el mismo; como es el caso de las harinas de trigo comerciales, las cuales son enriquecidas con ácido fólico, hierro y zinc (AOAC, 2000).

El contenido de grasa ha sido uno de los componentes menos estudiados en la semilla de Ramón. La literatura ha evidenciado que esta semilla se caracteriza por un bajo contenido de grasa, la cual varía desde 1.2 a 1.6% (FAO, 2011). Asimismo, por cada 100 g de semilla de Ramón presenta un bajo contenido de ácidos grasos saturados (0.17 g) y de ácidos grasos monoinsaturados (0.03 g). Debido a su bajo contenido de grasa, este podría ser recomendado e incorporado en una dieta baja en grasa (Arévalo, 2010).

El contenido de hidratos de carbono calculado fue de 77%; por el contrario, en el etiquetado nutrimental de la harina de semilla de Ramón utilizada en el presente estudio indica que tiene un

contenido de 65%. No obstante, diversos autores han reportado que la semilla de Ramón contiene aproximadamente 75% (FAO, 1961; Leung *et al*., 1961; Mayan Nut Institute; 2007). Incluso, Larqué-Saavedra (2014), Zamorano (2009) y Carter (2015), reportan un contenido de hidratos de carbono de 81.1 a 85.1%. Las diferencias que se presentan en los resultados pueden ser debido al tipo de técnica utilizada para la determinación y al estado morfológico en el que se encontraba la semilla durante su recolección y procesamiento (Carter, 2015).

Por último, los resultados observados en el contenido de proteína (10.1 ± 0.051%) son similares a los reportados en estudios previos. En este sentido, diversos autores han obtenido concentraciones de proteína de 10.1% (Pardo-Tejeda y Sánchez-Muñoz, 1980), 10.87% (Lozano *et al*., 1978), 10.42% (Flaster, 2007) y 10.52% (Arevalo y Bressani, 2013) en semillas de Ramón. Lo anterior, representa que esta matriz vegetal pudiera ser considerada como fuente rica en proteína, incluso con mayor contenido que otras proteínas vegetales: tales como trigo, maíz y arroz, las cuales han reportado un contenido de 9.3, 9.8 y 7.2%; respectivamente (Carter, 2015).

Las proteínas alimentarias además de tener propiedades funcionales y fisiológicas, al ser hidrolizadas en péptidos pudieran tener un efecto benéfico a la salud (Rizello *et al*., 2016). No obstante, estos péptidos con potencial actividad biológica deben ser liberados de la matriz alimentaria por enzimas digestivas durante el trayecto gastrointestinal, por procesamiento del alimento (maduración, cocción y fermentación) o por hidrólisis enzimática (Carrasco-Castrilla *et al*., 2012). Sin embargo, cuando la matriz alimentaria tiene alto contenido de hidratos de carbono, algunos pretratamientos son considerados para la producción de péptidos bioactivos, En este sentido, soluciones alcalina o enzimas que degradan hidratos de carbono (*e.g.* celulasa, vicozima y amilasa) son aprovechadas para permitir una mejor y mayor disponibilidad para la hidrólisis de proteína por medio de otros métodos como la fermentación (Esfandi *et al*., 2019a). Por lo anterior, en el presente estudio se empleó el uso de amilasa para hidrolizar los hidratos de carbono, así como bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de péptidos con potencial actividad biológica.

6.2. Cuantificación de Azúcares Totales en Harina Hidrolizada con α-amilasa

Como se mencionó anteriormente, es necesario que las proteínas estén disponibles para su

hidrólisis para la producción de péptidos bioactivos de matrices alimentarias que contienen alto contenido de hidratos de carbono (*e.g.* complejos). En este sentido, las sales y soluciones alcalinas son estrategias utilizadas para lograr esto, y en muchos casos el uso de enzimas que hidrolizan los hidratos de carbono, también son exploradas (Esfandi *et al*., 2019b). Por lo anterior, se determinó la producción de azúcares liberados después de la incubación con α-amilasa adicionado con un tratamiento térmico (121°C, 15 min) (Figura 2).

Los resultados mostraron un aumento significativo en la concentración de glucosa inicial de 1.42 ± 0.46 mg/mL, alcanzando valores de 28.16 ± 2.49 mg/mL de glucosa presentes en la harina de semilla de Ramón (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los valores obtenidos por Olguin Maciel (2015). El autor reporta una concentración final de 24.02 g/mL de glucosa después de incubar con α-amilasa y de un tratamiento térmico en harina de semilla de Ramón. Los alimentos con alto contenido de hidratos de carbono, afectan la disponibilidad de la proteína, debido a la formación de complejos entre la fibra y la proteína (Pontonio *et al*., 2020). Por lo anterior, diversos autores han realizado pretratamientos a la matriz alimentaria.

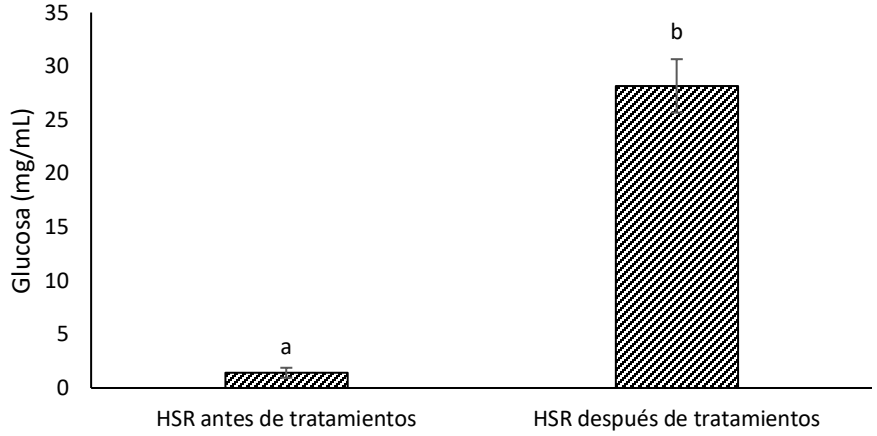


Figura 2. Concentración de glucosa presente en la harina de semilla de Ramón (5%) después de haber sido sometida a tratamiento con α-amilasa. HR = Harina de Semilla de Ramón.

Por otro lado, un estudio con sorgo exploró la adición de amiloglucosidasa para permitir la extracción de la proteína prolamina. Los resultados mostraron que el pretratamiento con la enzima, promovió la liberación de prolamina y éste, después de realizar estudios *in silico*, se identificó péptidos con actividad inhibidora de la ECA y de DPP-IV y antioxidante (Castro-Jácome *et al*.,

2020). Así mismo, con el objetivo de solubilizar la proteína en cebada, Pontonio *et al*. (2020) realizó un pretratamiento adicionando amiloglucosidasa; y posteriormente, fermentó con BAL. Los autores observaron el crecimiento de las mismas y una mayor acidificación. En el presente estudio, se adicionó α-amilasa para la liberación de azúcares con el objetivo de fermentar con BAL y así promover la proteólisis y liberación de péptidos con potencial actividad biológica.

6.3. Cinéticas de Crecimiento, pH y Actividad Proteolítica de *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en Harina de Semilla de Ramón

En las últimas décadas, la industria alimentaria ha tenido gran interés por los alimentos fermentados con BAL, debido a que ha sido asociado a efectos benéficos a la salud. Lo anterior, ha sido relacionado con los metabolitos producidos durante la fermentación, tales como péptidos (Venegas-Ortega *et al*., 2019). En el presente estudio se exploró con dos BAL (*Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572) la fermentación de la harina de semilla de Ramón para la producción de péptidos bioactivos. Por lo anterior, se inició estableciendo las condiciones de fermentación de la harina de semilla de Ramón para el subcultivo (Figura 3).

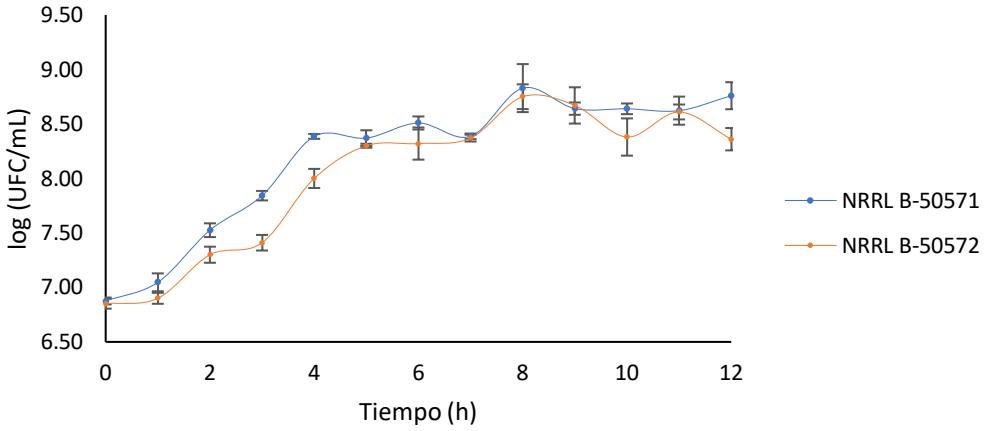
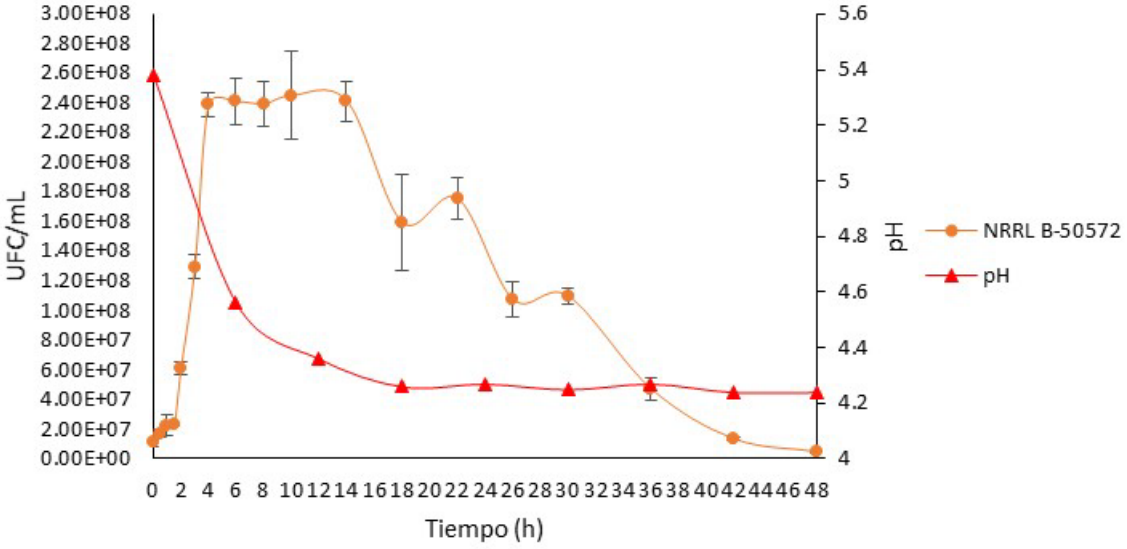


Figura 3. Curva de crecimiento del subcultivo de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y B-50572 en harina de semilla de Ramón durante 12 h a 30ºC. Los datos representan la media ± desviación estándar.

Los resultados mostraron que al tiempo 6.5 h la bacteria se encontraba en la etapa final de la fase exponencial. Estudios han reportado que la mayor actividad metabólica es en la etapa media de la fase exponencial (Kenny *et al*., 2003); mientras que en otro estudio reportan que en una matriz alimentaria (*e.g.* leche), la mayor actividad metabólica de las bacterias fue en la última etapa de la fase exponencial (Sasaki *et al*., 1995). Por lo anterior, se seleccionó el tiempo de 5.5 h de fermentación para el subcultivo en la harina de semilla de Ramón.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de cada bacteria (*L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572) en la harina de semilla de Ramón, con la finalidad de conocer el comportamiento y la concentración celular en el tiempo de 0 a 48 h de fermentación (Figuras 4 y 5). Como se observó en el subcultivo, las bacterias tuvieron la capacidad de crecer y fermentar esta matriz alimentaria. En el tiempo cero, ambas bacterias no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre ellas, presentando valores de 1.25×10^7 UFC/mL y 1.12×10^7 UFC/mL para *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572; respectivamente. Así mismo, no se presentó la fase de adaptación para ambas bacterias. Este comportamiento se presentó, debido a las condiciones previamente establecidas para la fermentación del subcultivo de la harina de semilla de Ramón (5.5 h). Como se mencionó anteriormente, durante la fase exponencial, las bacterias se encuentran metabólicamente más activas, a diferencia de la fase estacionaria (Sasaki *et al*., 1995; Williams *et al*., 2002; Kenny *et al*., 2003). Lo anterior, podría contribuir a tener una menor fase de adaptación; por lo tanto, el cultivo al ser inoculado a un mismo medio y bajo las mismas condiciones, mantiene la velocidad de crecimiento exponencial (Madigan *et al*., 2008).

Figura 4. Curva de crecimiento y cambios de pH de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 en harina de semilla de Ramón durante 48 h de fermentación a 30°C. Los datos representan la media ± desviación estándar.



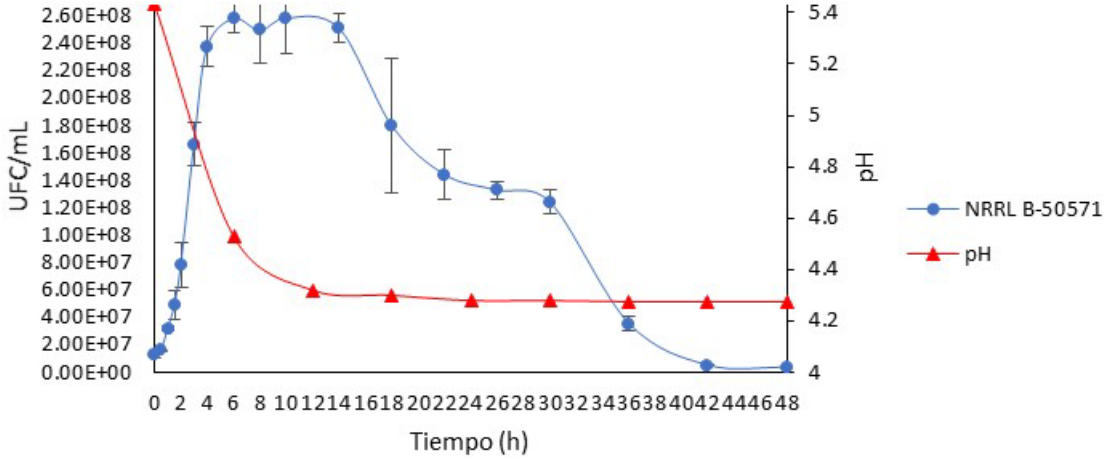


Figura 5. Curva de crecimiento y cambios de pH de *Lactococcus lactis* NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón durante 48 h de fermentación a 30°C. Los datos representan la media ± desviación estándar.

La fase exponencial finalizó a las 6 h para la harina de semilla de Ramón fermentada por *L. lactis* NRRL B-50571 y a las 4 h para la harina de semilla de Ramón fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572, alcanzando un máximo de crecimiento de 2.51 x 10^8 UFC/mL para NRRL B-50571 y 2.41 x 10^8 UFC/mL para NRRL B-50572. Ha sido ampliamente reportado que durante la fase exponencial, las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio (Charalampopoulos *et al*., 2002).

Posteriormente, la fase estacionaria se mantuvo hasta las 14 h de fermentación para ambas bacterias. Durante esta fase, el número de células que están multiplicándose es aproximadamente igual al número de células que están muriendo, dando lugar a un crecimiento asintótico, es decir, sin incremento o decremento en la cantidad de células viables (Agudelo *et al*., 2010). Finalmente, la fase de muerte inició a las 14 h y se continuó determinando hasta las 48 h de fermentación. En esta etapa se presentó el agotamiento de los nutrientes del medio e incremento de toxinas, lo cual provoca una disminución progresiva en el número de células viables (Madigan et al., 1997).

Con los datos obtenidos, se calcularon los parámetros cinéticos. Estos valores son utilizados como herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en laboratorio, puesto que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y productividad en los procesos (Duarte Torres, 1998). Se realizó un ajuste a las curvas de crecimiento con el modelo de Gompertz. En el Cuadro 2 se muestran los parámetros cinéticos de las cepas *L. lactis* NRRL B-50572 y NRRL B-50571 para un tiempo de 48 h de fermentación en la harina de semilla de Ramón. Los valores obtenidos de coeficiente de determinación (R^2) fueron mayores a 0.92, lo cual indica que el modelo explica ampliamente la varianza de los resultados y que pueden ser utilizados para describir el crecimiento poblacional con respecto al tiempo. Para *L. lactis* NRRL B-50571 presentó una máxima velocidad de crecimiento de 1.63 log UFC/mL/h y un tiempo de generación de 0.18 h. Con respecto a *L. lactis* NRRL B-50572 obtuvo 2 h una máxima velocidad de crecimiento de 1.35 log UFC/mL/ h y un tiempo de generación de 0.2. La velocidad máxima de crecimiento nos indica la población microbiana máxima alcanzada por unidad de tiempo durante la fermentación y se ve influenciada principalmente por factores como la composición del medio de cultivo, pH y temperatura (Mignone *et al*., 1994).

Por otro lado, el tiempo de generación es aquel requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2 (Del Aguilar y Delgado, 2015). Estos parámetros permiten comprobar el efecto de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan *et al*., 1997). Es importante mencionar que, aunque los valores que se obtuvieron para el tiempo de generación y la velocidad máxima de crecimiento, no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre cepas, estos valores fueron inversamente proporcionales entre sí, ya que *L. lactis* NRRL B-50571 presentó una mayor velocidad de crecimiento y un menor tiempo de generación. Los resultados obtenidos nos indica que las condiciones seleccionadas favorecieron el crecimiento de las bacterias, posiblemente usando para su metabolismo y crecimiento los azúcares liberados y la proteína como fuente de nitrógeno en la harina de semilla de Ramón.

Cuadro 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de Lactococcus lactis NRRL B-50571 y NRRL B-50572 derivados de la ecuación de Gompertz en harina de semilla de Ramon.

Muestra	MVC log (UFC/mL) /h	TG (h)	FL (h)
NRRL B-50571	1.638 ± 0.008 a	0.183 ± 0.001 a	NA
NRRL B-50572	1.358 ± 0.111 a	0.222 ± 0.018 a	NA

MVC: Máxima velocidad de crecimiento, TG: Tiempo de generación, FL: Fase lag. Literales iguales indican que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) entre columnas para cada tiempo de fermentación. Los datos representan la media ± desviación estándar.

Así mismo, en las Figuras 4 y 5 muestran los cambios de pH durante la fermentación de las bacterias en la harina de semilla de Ramón. El pH disminuyó significativamente ($p<0.05$) de 5.43 ± 0.007 a 4.56 ± 0.02 para *L. lactis* NRRL B-50571 y de 5.38 ± 0.021 a 4.53 ± 0.01 para *L. lactis* NRRL B-50572 a las 6 h de fermentación. La disminución se presenta debido a la acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos como productos de la fermentación de las BAL (Wang *et al*., 2021). Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio la fase de muerte de las bacterias comenzó a las 14 h de fermentación y el pH alcanzó su máxima disminución de 1 a las 12 h de fermentación, el pH se mantuvo disminuyendo a 4.36 ± 0.03 y 4.32 ± 0.01 para *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572; respectivamente. Por otro lado, ha sido reportado que un rápido crecimiento microbiano y rápida acidificación resulta en la reducción de los tiempos de fermentación (Charalampopoulos *et al*., 2002); lo cual se observó en el presente estudio. Esto se debe a la acumulación de ácidos orgánicos inhiben el crecimiento microbiano, debido a los protones no disociados o disociados liberados en el medio. En general, el crecimiento bacteriano depende de los factores ambientales, tales como pH, temperatura y acumulación de productos de la fermentación (Charalampopoulos *et al*., 2002).

Por otro lado, se determinó la actividad proteolítica de las bacterias *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 después del proceso de fermentación (48 h) en harina de semilla de Ramón (Figura 6). Los resultados mostraron que *L. lactis* NRRL B-50571 presentó 89.19 ± 19.10 mg/mL de L-leucina; mientras que *L. lactis* NRRL B-50572 presentó 77.98 ± 9.31 mg/mL de L-leucina, y no fueron significativamente diferente entre ellas ($P>0.05$). La actividad proteolítica de las bacterias consiste en la degradación de la proteína presente en una matriz alimentaria para sus requerimientos, tales como control del pH intracelular, generación de energía metabólica, resistencia a estrés y biosíntesis de proteína (Venegas-Ortega *et al*., 2019). Primero, las enzimas

presentes en la pared celular degradan a las proteínas en péptidos; posteriormente, estas son introducidas a la célula para ser degradadas en péptidos mas pequeños y en aminoácidos por las endopeptidasas intracelulares (Raveschot *et al*. 2020). La actividad proteolítica de cada bacteria depende en las enzimas presentes en la pared celular y los perfiles de endopeptidasas intracelulares, las variaciones genéticas y las condiciones necesarias para una óptima actividad enzimática (Alcántara *et al*., 2016).

Las bacterias evaluadas en el presente estudio son del mismo género y especie, y los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas (P>0.05) entre ellas en la actividad proteolítica. No obstante, la especificidad de cada bacteria en liberar péptidos con potencial actividad biológica es cepa dependiente. En este sentido, la generación de péptidos está relacionado con la actividad enzimática, y los factores que afectan la producción de los mismos, son cepa dependiente. A nivel molecular, la expresión del sistema proteolítico es afectado por la disponibilidad de la proteína, aminoácidos e hidratos de carbono. Adicionalmente, la actividad enzimática está influenciada por la fase de crecimiento de la bacteria; esta se encuentra activa durante la fase exponencial y al inicio de la etapa estacionaria; no obstante, disminuye conforme avanza la etapa estacionaria (Venegas-Ortega *et al*., 2019). Aunado a esto, otro estudio reportó que la actividad proteolítica reflejada en la cantidad de péptidos liberados durante la fermentación, se vio incrementada conforme avanzó las fases de crecimiento (Limón *et al*., 2015).

Aunado a esto, en el presente estudio se evaluó la actividad proteolítica después de haber sido sometidas a simulación gastrointestinal.

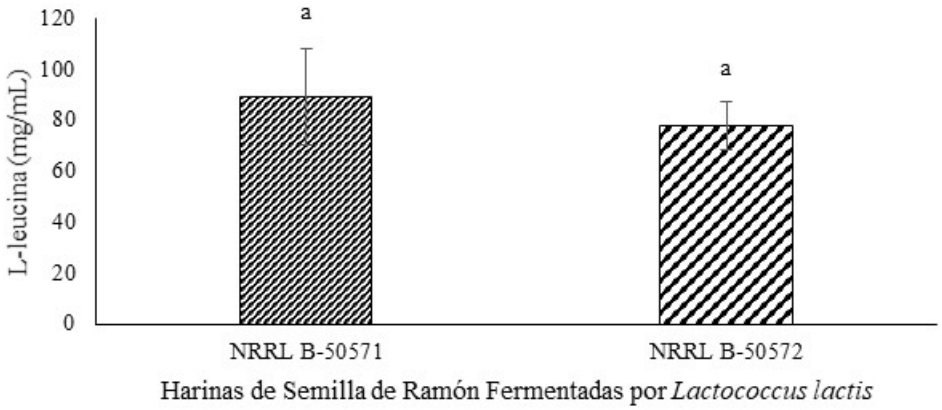


Figura 6. Actividad proteolítica de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón a las 48 h de fermentación. Barras que comparten literales no son significativamente diferentes (p>0.05). Los datos representan la media ± desviación estándar.

6.4. Digestión Gastrointestinal Simulada

Los estudios *in vivo* y los estudios clínicos son necesarios para demostrar los efectos fisiológicos de los diferentes alimentos funcionales; no obstante, los estudios *in vitro* son una alternativa para evaluar la funcionalidad de los mismos (Segura-Campos *et al*., 2010). Por lo anterior, se realizó una digestión gastrointestinal simulada a las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y no fermentada. En la Figura 7 podemos observar que después de la digestión gastrointestinal simulada, se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre ambas harinas fermentadas. Incluso, la actividad proteolítica incrementó 26.57 veces y 11.88 veces para las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572; respectivamente. Lo anterior, indica la acción de las enzimas digestivas durante el proceso para la liberación de péptidos a partir de las proteínas intactas o de los péptidos obtenidos de la fermentación bacteriana. En este sentido, determinar la resistencia de péptidos a través de la digestión gastrointestinal es un requisito para establecer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos. Además, durante este proceso, nuevos péptidos pudieran formarse con mayor o menor actividad biológica (Marseglia *et al*., 2019).

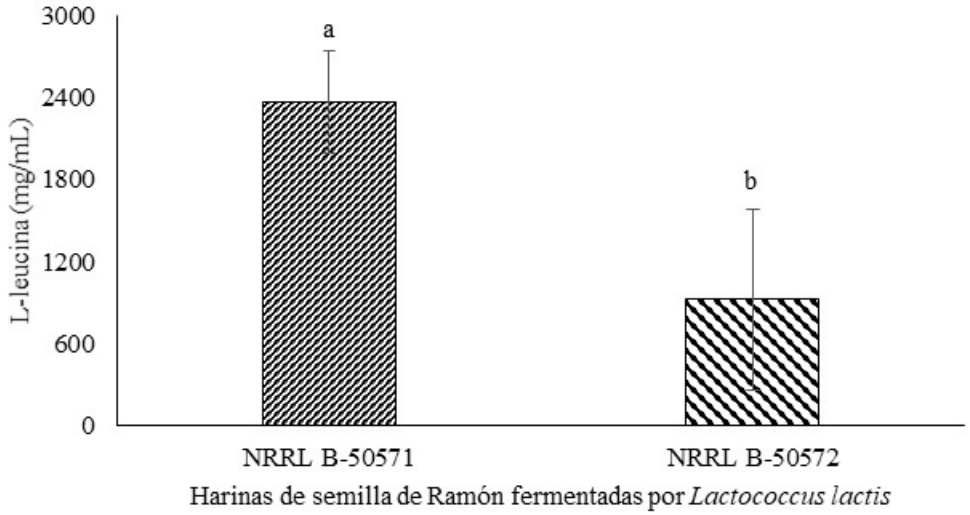


Figura 7. Actividad proteolítica de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en harina de semilla de Ramón a las 48 h de fermentación y sometidas a digestión gastrointestinal simulada. Literales diferentes muestran diferencias significativas ($p<0.05$). Los datos representan la media ± desviación estándar.

6.5. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina

El porcentaje de inhibición de la ECA de las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y no fermentada, antes y después de ser sometidas a digestión gastrointestinal se muestran en la Cuadro 3. Los resultados mostraron que la harina de semilla de semilla de Ramón fermentada con NRRL B-50571 presentó significativamente mayor ($P<0.05$) porcentaje de inhibición que la harina fermentada con NRRL B-50572 y el testigo; las cuales no fueron significativamente diferente ($P>0.05$) entre ellas. Lo anterior indica que la cepa NRRL B-50571 presentó especificidad para hidrolizar péptidos potencialmente inhibidores de la ECA. No obstante, después de realizar la simulación gastrointestinal, las muestras no presentaron inhibición.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de la ECA para harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada sometidas a simulación gastrointestinal.

Harina de semilla de Ramón	**Testigo**	***L. lactis* NRRL B-50571**	***L. lactis* NRRL B-50572**
Fermentada	28.85 ± 7.81 c	31.46 ± 13.72 a	22.97 ± 4.53 b
DGS	NA	NA	NA

Literales diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre muestras. Los datos representan la media ± desviación estándar. DGS: Digestión gastrointestinal simulada.

Estudios han reportado que después de la acción de enzimas digestivas en productos fermentados, la actividad inhibidora de la ECA puede aumentar al producirse un incremento de secuencias peptídicas más pequeñas (Gómez-Ruiz *et al*., 2004). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la acción de enzimas digestivas puede afectar negativamente la actividad inhibidora de la ECA de los péptidos (Quirós *et al*., 2009). Los autores evaluaron el impacto de la digestión gastrointestinal simulada en la estabilidad ocho péptidos antihipertensivos y encontraron que 3 de ellos fueron completamente hidrolizados y redujeron significativamente su actividad antihipertensiva (Quirós *et al*., 2009). Por otro lado, diversos estudios han reportado que para que los péptidos sean resistentes a enzimas gastrointestinales, deben poseer prolina en la cadena C-

terminal (Fitzgerald y Meisel, 2000). Por el contrario, otros péptidos han demostrado ser resistentes a enzimas gastrointestinales (Iwaniak y Minkiewicz 2007). En el presente estudio, la digestión gastrointestinal simulada afectó la bioactividad de la inhibición de la ECA de las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis*. Por lo anterior, estudios han empleado la encapsulación de péptidos con baja biodisponibilidad (Mohan *et al*., 2015). Sin embargo, es necesario realizar mas estudios donde evalúen esta tecnología.

Hasta el momento, no hay estudios donde identifiquen y evalúen la actividad inhibidora de la ECA de péptidos de la harina de semilla de Ramón. Sin embargo, se ha reportado que las fracciones proteicas mayoritarias en la harina de semilla de Ramón son globulinas y glutelinas (Gonzalez-Gonzalez, *et al*., 2020). Adicionalmente, Tovar-Perez *et al*. (2009), reportaron que aislados de proteínas de amaranto como globulinas y glutelinas presentan secuencias peptídicas con potencial antihipertensivo. Por lo anterior, son necesarios más estudios para optimizar las condiciones de fermentación para favorecer el aumento de producción de péptidos inhibidores de la ECA y la identificación de los mismos.

6.6. Actividad antitrombótica

las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y no fermentada, antes y después de haber sido sometidas a digestión gastrointestinal simulada fueron determinadas. Los resultados mostraron que en esta matriz alimentaria no se liberaron péptidos con esta actividad. A diferencia del presente estudio, otras matrices alimentarias de origen vegetal (*e.g.* semilla de amaranto), si han presentado actividad antitrombótica. Sin embargo, los autores reportan que obtuvieron los hidrolizados de proteína a partir del uso de enzimas comerciales, tales como alcalasa y tripsina (Sabbione *et al*., 2016).

6.7. Inhibición de Dipéptidil Peptidasa IV

El Cuadro 4 muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad inhibitoria de la DPP-

IV de las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y no fermentada, antes y después de haber sido sometidas a simulación gastrointestinal. No se encontró actividad en las harinas fermentadas y no fermentada. Por el contrario, después de haber sido sometidas a digestión gastrointestinal simulada presentaron una inhibición de 3.41 a 5.59%, las cuales no presentaron diferencias significativas (P>0.05) entre ellas. La DPP-IV funciona como una serina proteasa que se une a un dipéptido de una cadena polipeptídica que contiene una prolina o alanina en la penúltima posición del extremo amino terminal. Por lo anterior, péptidos con residuos distintos a Pro o Ala en la penúltima posición pueden ser sustratos de la DPP-IV de baja afinidad (Bleakley *et al*., 2017). Resultados similares han sido reportados en otras matrices vegetales. En este sentido, Vilcacundo *et al*. (2017b) aisló proteína de amaranto y quinoa; y no observaron la inhibición de DPP-IV. Sin embargo, después de someterlas a digestión gastrointestinal simulada, las muestras presentaron inhibición. Sus resultados fueron comparables a lo reportados en cereales derivados del altiplano como avena y trigo sarraceno (Wang *et al*., 2015).

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de la enzima DPP-IV para para harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada sometidas a simulación gastrointestinal.

Harina de Semilla de Ramón	**Testigo**	***L. lactis* NRRL B-50571**	***L. lactis* NRRL B-50572**
Fermentada	NA	NA	NA
DGS	3.65 ± 2.44 a	5.59 ± 0.49 a	3.41 ± 4.2 a

Los datos representan la media ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre muestras fermentadas y no fermentadas.

6.8. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de una matriz vegetal está determinada por interacciones entre diferentes compuestos bioactivos; tales como ácidos fenólicos (Ozer, 2017), y de nuestro particular interés péptidos bioactivos (Pan *et al*., 2020). Estos tienen diferentes mecanismos de acción para retrasar o inhibir el deterioro oxidativo causado por los radicales libres (Nicácio *et al*., 2017). Por

este motivo, la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se realiza mediante diferentes métodos complementarios, que evalúan una diversidad de mecanismos de reacción y, por tanto, no son delimitados para un compuesto un específico (Floegel *et al*., 2011). En general, la determinación de la actividad antioxidante se fundamenta en dos principios, en la transferencia de electrones (*e.g.* método del ABTS, DPPH, entre otros), y en la transferencia de átomos de hidrógeno (*e.g.* método del ORAC, TRAP, entre otros) (Huang *et al*., 2005). Por lo anterior, la actividad antioxidante de las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y no fermentada, antes y después de ser sometidas a simulación gastrointestinal se determinó mediante los métodos ABTS y ORAC (Figuras 8 y 9).

Los resultados mostraron que las harinas de semilla de Ramón fermentadas y no fermentada (testigo) presentaron actividad antioxidante por el método de ABTS y del ORAC (Figuras 8 y 9). En particular, se encontró un incremento de actividad antioxidante por el método del ABTS (20.98 y 28.34 μM de Trolox) después de haber sido fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572; respectivamente; no obstante, no fue significativamente mayor (P>0.05) (Figura 8).

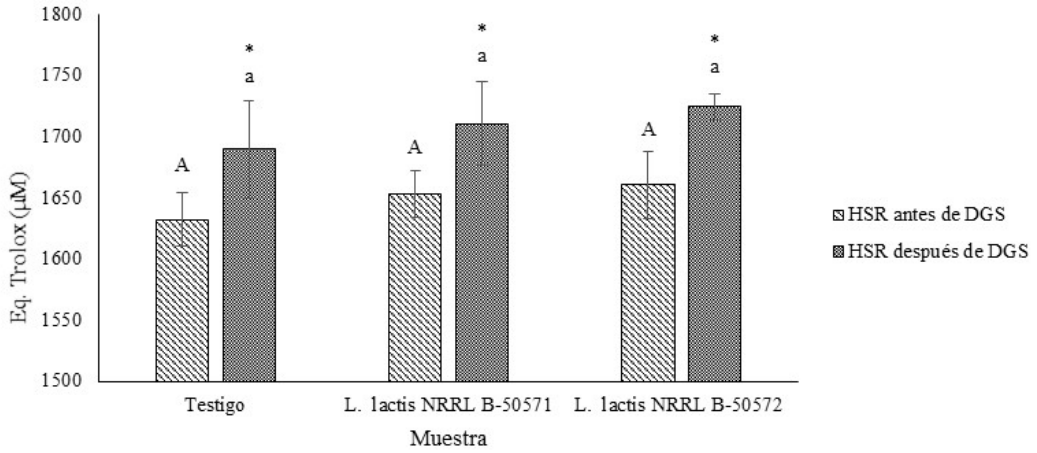


Figura 8. Actividad antioxidante determinada mediante método ABTS para muestras de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada, antes y después de ser sometidas a simulación gastrointestinal. Los datos representan la media ± desviación estándar. Literales iguales indica que no hay diferencias significativas entre barras (P>0.05). * indica diferencias significativas (P<0.05) después de haber sido sometidas a digestión gastrointestinal.

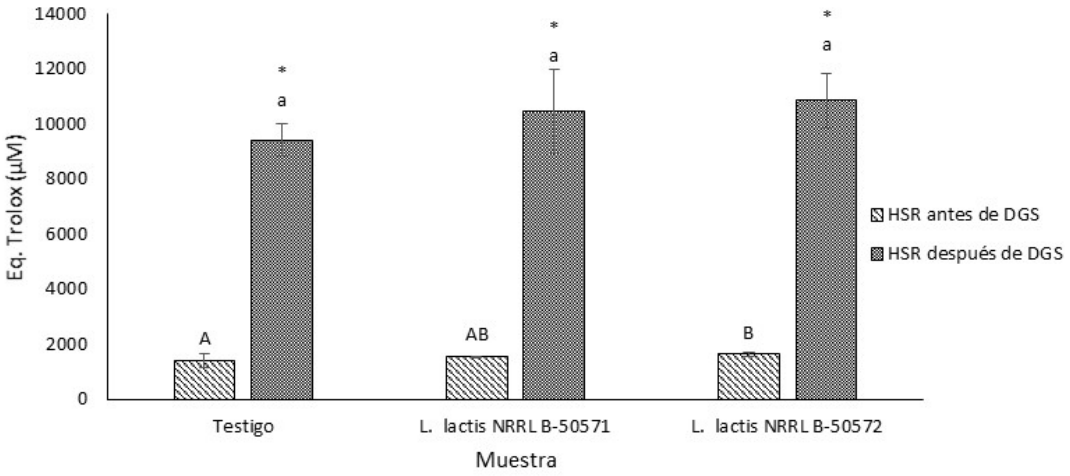


Figura 9. Actividad antioxidante determinada mediante método ORAC para muestras de harina de semilla de Ramón fermentada por *Lactococcus lactis* y no fermentada, antes y después de ser sometidas a simulación gastrointestinal. Los datos representan la media ± desviación estándar. Literales iguales indica que no hay diferencias significativas entre barras (P>0.05). * indica diferencias significativas (P<0.05) después de haber sido sometidas a digestión gastrointestinal.

De manera similar, las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 presentaron una diferencia mayor de 124.4 y 236.1 µM de Trolox; respectivamente, con respecto al testigo; sin embargo, no fueron significativamente diferente (P>0.05) (Figura 8). Por otro lado, la actividad antioxidante por ambos métodos aumentó significativamente (p<0.05) después de someterlas a digestión gastrointestinal simulada. En este sentido, la actividad antioxidante incrementó 1.03 y 1.04 veces por el método del ABTS y 6.84 y 6.61 veces por el método del ORAC para las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572; respectivamente.

La actividad antioxidante de semilla de Ramón ha sido explorada en estudios anteriores (Ozer, 2017; Quintero-Hilario *et al*., 2019; Subiria-Cueto *et al*., 2019;). En este sentido, Ozer (2017) determinó que la actividad antioxidante de la semilla de Ramón fue mayor que otras fuentes de oleaginosas, tales como almendra, cacahuate y nuez de Castilla. Además, el autor atribuyó la actividad antioxidante a los ácidos fenólicos identificados (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vainílico, ácido caféico, y ácido p-cumárico) y a un flavonoide (catequina). Por otro lado, Quintero-Hilario *et al*. (2019) tostó a dos temperaturas semillas de Ramón y determinó la actividad antioxidante. Los autores concluyeron que la actividad incrementó con el nivel de tostado y su actividad fue atribuida al incremento de fenoles totales y taninos condensados. Adicionalmente,

Subiria-Cueto *et al*. (2019) preparó una tortilla de harina de semilla de Ramón, y sus resultados mostraron que presentó mayor actividad antioxidante que una tortilla de harina; y su actividad fue atribuida a compuestos fenólicos principalmente ácido clorogénico y otros ácidos fenólicos como ácido quínico.

En el presente estudio, se observó actividad antioxidante en la harina de semilla de Ramón sin fermentar, por lo que su actividad puede ser atribuida a los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, taninos y flavonoides presentes. No obstante, la actividad antioxidante fue mayor en las harinas de semilla de Ramón fermentadas por *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 que en el testigo. Por lo anterior, esas diferencias pudieran ser atribuidas a la liberación de péptidos con actividad antioxidante. En este sentido, la liberación de péptidos antioxidantes de origen vegetal ha sido reportado en diversos estudios utilizando enzimas comerciales en arroz integral (Wattanasiritham *et al*., 2016), en garbanzo (Torres-Fuentes *et al*., 2015), entre otros. Mientras que la obtención de péptidos antioxidantes por medio de fermentación ha sido ampliamente reportado en leche (Pan *et al*., 2020); hay estudios donde exploran fuentes vegetales fermentadas con semilla de ajonjolí (Xu *et al*., 2014), con soya (Ruan *et al*., 2020) y fenogreco (Setti *et al*., 2017).

7. CONCLUSIONES

El presente estudio evaluó la potencial actividad biológica (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, inhibición de la DPP-IV, actividad antitrombótica y/o actividad antioxidante) de la harina de semilla de Ramón fermentada por Lactococcus lactis NRRL B-50571 y NRRL B-50572. Los resultados mostraron que ambas cepas tuvieron la capacidad de fermentar la HSR liberando péptidos con potencial actividad biológica. La evaluación de las diferentes actividades biológicas en la HSR fermentada, mostró que fue necesario determinarlas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada (DGS), ya que si bien la inhibición de la DPP-IV incrementó después de la DGS, la inhibición de la ECA disminuyó. Por otro lado, la actividad antioxidante se mantuvo, antes y después de la DGS.

Los pseudocereales, tales como la semilla de Ramón, son alimentos subexplotados ya que a pesar de que en el pasado fueron parte importante de la dieta de los Mayas, después de la conquista por España, estos fueron sustituidos por el cultivo de cereales tales como el trigo y la cebada. No obstante, la explotación de la harina de semilla de Ramón como alimento, podría ser una alternativa sustentable, no solo por su alto valor nutricional y por su potencial actividad biológica, sino también porque contribuiría a incrementar la diversidad de los recursos naturales, ya que, por sus características agronómicas y su fácil adaptación a condiciones adversas, podría ser de importancia económica, social y ecológica

8. REFERENCIAS

Adebiyi A., Adebiyi A., Yamashita J., Ogawa T. & Muramoto K. (2009). Purification and characterization of antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolysates. European Food Research. 228: 553–563.

Adebowale A.A., Adegoke M.T., Sanni S.A., Adegunwa M.O., & Fetuga G.O. (2012). Functional properties and biscuit making potentials of sorghum wheat flour composite. American Journal of Food Technolology. 7(6):272-279.

Ademiluyi O. & Oboh G. (2015). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and hypocolesterolemic effect of some fermented tropical legumes in streptozotocin-induced diabetic rats. International Journal of Diabetes in Developing Countries. 35(4): 493–500.

Agudelo C., Ortega R. & Hoyos L. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inoculos lácticos. Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias. 7(2):9-16.

Agyei D. & Danquah K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. Biotechnol. 29: 272–277.

Ahn B., Jeon J., Kim T. & Je Y. (2012). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by alcalase hydrolysis. Process Biochemistry. 47(12): 2240-2245.

Ahnfelt-Ronne I. (1991). A textbook of drug design and development. Switzerland: Harvood Academic Publishers. 302-307.

Alcántara C. Bäuerl, C., Revilla-Guarinos A., Pérez-Martínez G., Monedero V., & Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR- family response regulator in Lactobacillus casei. Molecular Microbiology. 100(1), 25–41.

Aluko E. & Monu E. (2003). Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. Food and Chemical Toxicology. 68: 1254–1258.

AOAC (2000). Official methods of analysis association of official analytical chemists (18th ed.). Washington. DC. USA: AOAC.

Apud R., Vaquero R., Rollan G., Stival G. & Fernández A. (2013). Increase in antioxidant and antihypertensive peptides from Argentinean wines by Oenococcus oeni. International Journal of Food Microbiology. 163:166–170.

Arévalo I. (2010). Respuesta glicémica de la semilla del Ramón, *Brosimum alicastrum* en mujeres de 16 a 25 años de edad residentes de la Ciudad Capital, Guatemala. Tesis. Lic. Nutricionista. Guatemala. Facultad Ciencias de la Salud.

Arévalo A. & Bressani R. (2013). Respuesta glicémica de la semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) en mujeres de 16 a 25 años de edad, residentes de la ciudad capital, Guatemala. *Revista de La Universidad de Guatemala.* 25: 66-71.

Arhewoh J., Ahonkhai E. & Okhamafe A. (2005). Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides. African Journal of Biotechnology. 4: 1591-1597.

Arnold E., Arvanitakis Z., Macauley-Rambach L., Koenig M., Wang Y., Ahima S. & Stoeckel E. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. Nature Reviews Neurology. 14(3): 168.

Bagul M., Sonawane S. & Arya S. (2018). Bioactive characteristics and optimization of tamarind seed protein hydrolysate for antioxidant-rich food formulations. Biotech. 8: 218.

Barazarte H., Sangronis E., María Moreno I., Garmendia C. & & Mujica Y. (2015). Laminados de guayaba (*Psidium guajava* L.) enriquecidos con inulina y calcio. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 65(4): 225-233.

Barquera-Bibiano, Z. (2014) Obtención de bioetanol a partir de la semilla del ramón (*Brosimum alicastrum* sw). Tesis de maestria. Posgrado en Ciencias en Energía Renovable. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). Mérida, Yucatán, México.

Bleakley S., Hayes M., Shea O., Gallagher E. & Lafarga T. (2017). Predicted release and analysis of novel ACE-I, renin and DPP-IV inhibitory peptides from Common oat (*Avena sativa*) Protein hydrolysates using *in silico* análisis. Foods. 6:118.

Boer A., Urlings M. & Bast A. (2016). Active ingredients leading in health claims on functional foods. Journal of Functional Foods. 20: 587-593.

Borja-Lozano E. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de Lupinus mutabilis mediante proteasas de Bacillus sp. Tesis de Licenciatura Químico farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. Pag: 24.

Carrasco-Castilla, J., Hernandez-Alvarez, A. J., Jimenez-Martınez, C., Gutierrez-Lopez, G. F., & Davila-Ortiz, G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. Food Engineering Reviews, 4, 224–243.

Carter T. (2015). Chemical and Functional Properties of *Brosimum Alicastrum* Seed Powder (Maya Nut , Ramón Nut). Clemson University, USA.

Castro-Jácome T.P., Alcántara-Quintana L.E., & Tovar-Pérez E.G. (2020). Optimization of Sorghum Kafirin Extraction Conditions and Identification of Potential Bioactive Peptides. BioResearch Open Access. 9.1:198-208.

Charalampopoulos D., Pandiella S.S., & Webb C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. Journal of Applied Microbiology. 92:851–859.

Church F., Swaisgood H. & Porter D. (1983). Catignani. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. Journal of Dairy Science. 66(6): 1219-1227.

Coda R., Cassone A., Rizzello C.G., Nionelli L., Cardinali G., & Gobbetti M. (2012). Antifungal activity of Wickerhamomyces anomalus and Lactobacillus plantarum during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. Applied and Environmental Microbiology. 77: 3484 –3492.

Cordero F., Mesén M., Montero J., Stewart D., Boshier J., Chamberlain T., Pennington M., Hands C. & Hughes G. (2003). Descripciones de especies de árboles nativos de América Central (*Brosimum alicastrum* Sw.). Consultado el: 10-05-2021. http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/brosimum_alicastrum.pdf.

Cotabarren J., Rosso M., Garcia-Pardo L., Rivera W. & Parisi M. (2019). Adding value to the chia (Salvia hispanica L.) experller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. Food Chemistry 274:848–56.

Dang Y., Tingyi Z., Li H., Jinxuan C., Yangying S. & Daodong P. (2019) *in vitro* and in vivo studies on the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptides isolated from broccoli protein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 67(24): 6757-6764.

Dei Più L., Tasson, A., Serrazanett I., Ferri M., Babini E., Tagliazucchi D. & Gianotti A. (2014). Exploitation of starch industry by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. Food Chemistry. 155: 199–206.

Del Aguilar J. & Delgado J. (2015). Evaluacion de los hidrolizados de *Chenopodium* quinoa wildnow (quinua) Hordeum vulgare (cebada) y glycine max (soya) como sustrato beneficioso para la preparación de un producto nutraceútico a base de lactobacillus acidophilus (Tesis de pregrado). Universidad nacional de Trujillo. Trujillo, Peru.

Duarte T. (1988) Introducción a la ingenieria bioquímica. Ed Universidad Nacional de Colombia: Bogota. 198 p.

DuBois A., Botelho S., Bedell G., Marshall R. & Cornroe J. (1956). A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume; a comparison with a nitrogen wash-out method for measuring functional residual capacity. Journal of Clinical Investigation. 35: 322-326.

Dziuba J, Niklewicz M, Iwaniak A, Darewicz M. & Minkiewicz P. (2005). Structural properties of bioactive animal protein fragments accessible for proteolytic enzymes. Polimery. 6: 42-49.

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2018). Presentación de resultados. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Esfandi R., Walters M.E., & Tsopmo A. (2019a). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. Heliyon. 5: 538.

Esfandi R., Willmore W.G., & Tsopmo A. (2019b). Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their *in vitro* antioxidant and metal chelating properties. Food Chemistry. 279:49-57.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (1961). Cultivos andinos FAO. (en línea). Consultado 10/05/2021. Disponible en http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/- cdrom/contenido/libro11/cap1.htm.

Figueroa-Hernández C., Cruz-Herrero A., Rodriguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. & Jiménez-Guzmán J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11(1): 23–43.

Fitzgerald R. & Meisel H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. British Journal of Nutrition. 84: 33-37.

Flaster T. (2007). *(Brosimum Alicastrum* SW.) And B. Alicastrum- Derived Ingredients for use in Traditional Foods Generally Recognized as Safe (GRAS). Manuscrito inédito extraído de: https://mayanutinstitute.org/es/biblioteca. 38p.

Fletcher J. (2016). Pseudocereals: Overview. En C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, & J. Faubion. Encyclopedia of food grains Vol 1: the world of food grains. 2(1): 491.

García C., Endermann G., García E. & Marina M. (2013). HPLC-Q-TOFMS identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (Prunus cerasus L.) subproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 63: 1514-1520.

Gómez-Ruiz J., Ramos M. & Recio I. (2004). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1054(1): 269-277.

González-González R., Peraza-Campos A., Ceballos-Magaña S. (2020). Biochemical and functional characterization of albumins and globulins of *Brosimum alicastrum* seeds. Journal Food Process Preservation. 44: 4679.

Gorrell D. (2005). Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. Clinical Science. 108(4): 277–292.

Gottschick W. (1994) The use of enzyme in food production. Food Technology Europe. 2: 158-160.

Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M. & Mukaihara, T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. Food Chemistry. 134: 797-802.

He R., Ju X., Yuan J., Wang L., Girgih T. & Aluko E. (2012). Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. Food Research International. 49(1): 432–438.

Hernández-González O., Vergara-Yoisura S. & Larqué-Saavedra A. (2014). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. Bothalia Journal. 44(6): 70–81.

Hernández-Ledesma B., Contreras M. & Recio I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation to foods. Advances in Colloid and Interface Science. 165: 23-35.

Hoben H. J., & Somasegaran P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of Rhizobium spp. In inoculants made from presterilized peatt. Applied and Environ- mental Microbiology. 44 (5):1246-1247.

Huang D., Ou B. & Prior L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841-1856.

Huang H., Sun J., He H., Dong H. & Li T. (2011). Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry. 128: 968–973.

Huang H., Sun J., He H., Dong W. & Li T. (2014). Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry. 128: 968–973.

Iwaniak A. & Iinkiewicz P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria. 6(3): 5-15.

Juárez M. & Perote A. (2010) Alimentos saludables y de diseño especifico. International Marketing

and Comunications. 13: 210.

Karadag A., Ozcelik B. & Saner S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. Food analytical methods. 2(1): 41-60.

Kenny O., FitzGerald R.J., O'Cuinn G., Beresford T., Jordan K. (2003). Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of Lactobacillus helveticus. International Dairy Journal. 13:509-516.

Kunji R., Mierau I., Hagting A., Poolman B. & Konings N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 70: 187-221.

Kuranov S., Tsypysheva I., Khvostov M., Zainullina F., Borisevich S., Vakhitova Y. & Salakhutdinov N. (2018). Synthesis and evaluation of camphor and cytisinebased cyanopyrrolidines as DPP-IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 26(15): 4402–4409.

Lacroix E. & Li-Chan E. (2013). Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP- IV) and a-glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61:7500–7506.

Larqué-Saavedra A. (2014). *Brosimum alicastrum*. Ramón. Gaceta. 6(49):6–33.

Leung M. & Flores M. (1961). Food composition tables for use in Latin America. Institute of Nutrition of Central America and Panama., & United State. 6th edición. Bethesda, Md. 145p.

Limón R.I., Peñas E., Torino M.I., Martínez-Villaluenga C., Dueñas M., & Frías J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. Food Chemistry. 172:343-352.

Lozano O., Shimada A. & Avila E. (1978). Valor alimenticio de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) para el pollo y el cerdo. Tec. Pec. Mex. 34: 100-104.

Machado M., Steel J., Alvim D., de Morais C. & Andre M. (2015). Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. LWT - Food Science and Technology. 62(2): 1011-1018.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (1997) Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hal. 8th edición. Upper Saddle River, N.J. 1058p.

Madigan M., Martinko J., Dunlap P. & Clark D. (2008). Brock biology of microorganismos 12th end. Int Microbiol. 11: 65-73.

Malaguti M., Dinelli G., Leoncini E., Bregola V., Bosi S., Cicero F. & Hrelia S. (2014). Bioactive peptides in cereals and lugumes: Agronnomical, biochemical and clinical aspects. International Journal of Molecular Sciences. 15: 21120-21135.

Marseglia A., Dellafiora L., Prandi B., Lolli V., Sforza S., Cozzini P., Tedeschi T., Galaverna G., & Caligiani A. (2019). Simulated Gastrointestinal Digestion of Cocoa: Detection of Resistant Peptides and *In Silico*/*In Vitro* Prediction of Their Ace Inhibitory Activity. Nutrients. 11: 985.

Mayan Nut Institute, Ramón seed (*Brosimum alicastrum* Sw.) and Ramón seed derived ingredients for use in traditional foods. (2007). Guatemala. 1: 15.

Meiners M., Sánchez-Garduño C. & de Blois S. (2009). The ramón: fruit of our culture and root

for conservation. Biodiversitas. 87: 7-10.

Meisel H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. Biofactors. 21: 55-61.

Mendoza Salazar Adilene. (2020). Potencial actividad antioxidante y antihipertensiva de extractos de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulin (*Sphenarium purpurascens*) fermentados con cepas específicas de *Lactoccocus lactis* (Tesis de maestria). Centro de investigación en alimentacion y desarrollo (CIAD) A.C. Hermosillo Sonora.

Mignone C., Yantorno O. & Estola R. (1994). Microbiologia industrial. Buenos Aires, Argentina: Organización de Estados Americanos. 103p.

Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C. & Brodkorb A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food & Function. 5(6):1113–1124.

Minervini F., y Rizzello C. (2007). Bioactive peptides in dairy products. In Y. H. Hui Handbook of food products manufacturing. Second edition: 2308.

Mohan A., Rajendran R.C.K., He, Q.S., Bazineta L., & Udenigwe C.C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. RSC Advances. 5:79270-79278.

Mojica L. & González de Mejia E. (2016). Optimization of enzymatic production of antidiabetic peptides from black bean (Phaseolus vulgaris L.) proteins, their characterization and biological potential. Food & Function. 7: 713–727.

Montoya-Rodriguez A., Gonzalez de Mejía E., Dia V., Reyes-Moreno C. & Milan J. (2014). Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced humanTHP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF-κB signaling. Molecular nutrition and food research. 58: 1028-1041.

Morales D., Miguel M. & Garcés-Rimón M. (2020). Pseudocereals: a novel source of biologically active peptides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54: 1-8.

Morales O. & Herrera G. (2009). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz.): Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. Yucatán, Mexico.

Mudgil P., Omar S., Kamal H., Kilari P. & Maqsood S. (2019). Multi-functional bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed quinoa and amaranth proteins. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 110: 207–213.

Mulero Cánovas J., Zafrilla P., Martínez A., Leal M. & Abellán J. (2011). Bioactive peptides. Arteriosclerosis Research and Clinic. 23: 219-227.

Navruz-Varli S. & Sanlier N. (2016). Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium* quinoa Willd.). Journal of Cereal Science. 69: 371-376.

Nogata Y., Nagamine T., Yanaka M. & Ohta H. (2009). Angiotensin I-converting inhibitory peptides produced by autolysis reaction from wheat bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 6618-6622.

Olguin Maciel E. (2015). Estudio para optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.). Centro de investigacion cientifica de Yucatan A.C. Mérida, Yucatán, México.

OMS, World Health Organization/ Organización Mundial de la Salud (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo: una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2-spa.pdf.

Ortiz Escarza, J. M. & Medina López, M. E. (2020). Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? Educación Química. Vol 31(1), 1-11.

Ortíz M. & Herrera L. (2009). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz.). Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje, 2009, CONAFOR: México.

Ozer H. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with commercial nuts. International Journal of Food Properties. 20(11): 2772–2781.

Pablo-Osorio B., Mojica L. & Urías-Silvas J. (2019). Chia seed (Salvia hispanica L.) pepsin hydrolysates inhibit angiotensin-converting enzyme by interacting with its catalytic site. Journal of Food Science. 84(5): 1170–1179.

Pan M., Liu K., Yang J., Liu S., Wang S., & Wang S. (2020). Advances on Food-Derived Peptidic Antioxidants—A Review. Antioxidants. 9:799.

Pardo-Tejeda E. & Sánchez-Muñoz C. (1980). *Brosimum alicastrum* (Ramón, capomo, ojite, ojoche) recurso silvestre tropical desaprovechado. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos Bióticos. 2da edición. Xalapa, Veracruz. 31p.

Peters C. & Pardo-Tejeda C. (1982) *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and potential in Mexico, Economic Botany. 36: 166-175.

Piatti C., Grae-Hönninger S. & Khajehei F. (2019). Food Tech Transitions Reconnecting Agri-Food, Technology and Society. 1th edición. Springer International Publishing. 174p.

Pontonio E., Dingeo C., Di Cagno R., Blandino M., Gobbetti M., & Rizzello C.G. (2020). Brans from hull-less barley, emmer and pigmented wheat varieties: From by- products to bread nutritional improvers using selected lactic acid bacteria and xylanase. International Journal of Food Microbiology. 13: 380-384.

Preza A., Jaramillo M., Puebla A., Mateos J., Hernandez R, & Lugo E. (2010). Antitumor activity against murine lymphoma l5178y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao L.*) seeds in relation with *in vitro* antioxidant activity. Complementary and Alternative Medicine. 10: 61.

Quevedo J., Arceo A., Farnés C. & Díaz T. (2001). Combinaciones enzimáticas en la obtención de hdrolizados proteicos a partir de Chorella vulgaris. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 15(2): 85-89.

Quintero-Hilario C.C., Esparza-Torres F., García-Mateos M.R., Ybarra-Moncada M.C., & Hernández-Ramos L. (2019). Effect of roasting on the nutritional value and antioxidant components of Maya nut (*Brosimum alicastrum*: Moraceae). Revista Chapingo Serie Horticultura. 25(3):1 99-212.

Quirós A., Contreras M., Ramos M., Amigo L. & Recio I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β-casein-peptides with antihypertensive properties. Peptides. 30: 1848–1853.

Raksakulthai N. & Haard N. (1992). Correlation between the concentration of peptides and amino acids and flavour off ish sauce. Asean Food Journal. 7: 86-90.

Raveschot C., Cudennec B., Deracinois B., Frémont M., Vaeremans M., Dugersuren J., Demberel S., Drider D Dhulster P., Coutte F., & Flahaut C. (2020). Proteolytic activity of Lactobacillus strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis. Food Chemistry. 304: 125.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical catión decoloration assay. Free Radical Biology and Medicine. 26(10): 1231-1237.

Ritian J., Xiangyu T., Jiaqi S., Dangfeng W. & Ning L. (2020). Identification of novel DPP–IV inhibitory peptides from Atlantic salmon (Salmo salar) skin. Food Research International. 133.

Rivero-Pino F., Guadix A. & Guadix E. (2021). Identification of novel dipeptidyl peptidase IV and α-glucosidase inhibitory peptides from *Tenebrio molitor*. Food and Function. 2: 4376-4386.

Rizello C.G., Tagliazucchi D., Babini E., Rutella G. S., Taneyo Saa D.L., & Gianotti A. (2016). Bioactive peptides from vegetables food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. Journal of Functional Foods. 27:549-569.

Sabbione A., Nardo A., Añon C. & Scilingo A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. Journal of Functional Foods 20: 204–214.

Sánchez V. & Méndez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Revista de Investigacion Medica Sur Mexico. 20(3): 161-168.

Sarmadi B. & Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 31(10): 1949–1956.

Sarmiento-Rubiano A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. Colombia. ORINOQUIA. 10: 16-23.

Sasaki M., Bosman W. & Tan T. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacillus. Journal of DaJr,'Reseamh. 62: 601-610.

Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 394-406.

Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., & Betancour-Ancona D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Rev. Chil. Nutr. 37(3):383-391.

Setti K., Kachouri F., Hamdi M. (2017). Improvement of the antioxidant activity off enugreek protein isolates by *Lactococcus lactis* fermentation. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 24:499–509.

Shahidi F. & Zhong Y. (2008). Bioactive Peptides. Journal of AOAC International. 91(4): 914–931.

Sheih I., Fang T. & Wu T. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. Food chemistry. 115(1): 279-284.

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. & Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthium on the autooxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 945–948.

Singh S., Bali V., Sharma L. & Mangla J. (2014). Production of fungal amylases using cheap, readily Available agro residues, for potential application in textile industry. BioMed Research International. 14: 1-9.

Soffer R. (1976). Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. Annual Review of Biochemistry. 45: 73-94.

Soltero R. & Ekwuribe N. (2005). The oral delivery of protein and peptide drugs. Drug delivery, principles and applications. 10: 106-110.

Subiria-Cueto R., Larqué-Saavedra A., Reyes-Vega L., de la Rosa A., Santana-Contreras E., Gaytán-Martínez M. & Martínez-Ruiz N. (2019). *Brosimum alicastrum* Sw. (Ramón): An alternative to improve the nutritional properties and functional potential of the wheat flour tortilla. Foods. 8(12): 613.

Taniya S., Reshma V., Shanimol S., Gayatri K. & Priya S. (2020). Bioactive peptides from amaranth seed protein hydrolysates induced apoptosis and antimigratory effects in breast cancer cells. Food Bioscience. 35: 100.

Toldrá F., Reing M., Aristoy M. & Mora L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. Food Chemistry. 267: 395-404.

Torres-Fuentes C., Contreras-Gámez M., Recio I., Alaiz M., Vioque J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chemistry. 180:194–202.

Tovar-Pérez E., Guerrero I., Farrés A. & Soriano J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. Food Chemistry. 116: 437-444.

Tovar-Pérez E., Guerrero-Legarreta I., Farrés-González A. & Soriano-Santos J. (2015). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. Food Chemistry. 116(2):437-444.

Tsai J., Chen T., Pan B., Gong S. & Chung M. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. Food chemistry. 106(2): 552-558.

Tulipano G., Faggi L., Nardone A., Cocchi D. & Caroli M. (2015). Characterization of the potential of β-lactoglobulin and α-lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: *in silico* and *in vitro* comparative studies. International Dairy Journal. 48: 66-72.

Tur J. & Bibiloni M. (2015). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. Trends in Food Science & Technology. 50: 144-158.

Vanvi A. & Tsopmo A. (2016). pepsin digested oat bran proteins: separation, antioxidant activity, and identification of new peptides. Journal of Chemistry. 47:1-8.

Vega-López A., Valdez-Hernández J. & Cetina-Alcalá V. (2003). Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. en la costa del Pacífico mexicano. Madera y Bosques. 9(1): 27-53.

Velarde-Salcedo A. (2013). *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus* hypochondriacus L.) proteins. Food Chemistry. 136: 758–764.

Venegas-Ortega M.C., 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. 18:1039-1051.

Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of Nutrition. 92: 357-66.

Vermeulen N., Gänzle M. & Vogel R. (2006). Influence of peptide supply and co-substrates on phenylalanine metabolism of Lactobacillus sanfranciscensis DSM20451 and Lactobacillus plantarum TMW1.468. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 3832–3839.

Vidal-Carou M.C.V. (2008). Alimentos funcionales, Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a como declarar sus efectos sobre la salud. Revista Humanitas. 24: 27.

Vilcacundo R. (2017a). *In vitro* chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium* quinoa Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. Food Research International. 105: 403–411.

Vilcacundo R., Martínez-Villaluenga C. & Hernández-Ledesma B. (2017b). Release of dipeptidyl peptidase IV, α-amylase and α-glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium* quinoa Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Journal of Functional Foods. 35: 531-539.

Vioque J., Sánchez-Vioque R., Pedroche J., Yust M. & Millán F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. Grasas y Aceites. 52: 127-131.

Wang W. & Gonzalez E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. CRFSFS. 4: 63-78.

Wang D., Wang L., Zhu F., Zhu J., Chen X. & Zou L. (2008). *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). Food Chemistry.107:1421-8.

Wang, F., Yu G., Zhang Y., Zhang B. & Fan J. (2015). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), and highland barley (*Hordeum vulgare trifurcatum* (L.) Trofim) proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 63: 9543–9549.

Wang L., Dong C., Li X., Han W. & Su X. (2017). Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources. Oncology Reports. 38: 637-651.

Wang Y., Wu J., Lv M., Shao Z., Hungwe M., Wang J., Bai X., Xie J., Wang Y., & Geng W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 9: 612.

Wattanasiritham L.; Theerakulkait C.; Wickramasekara S.; Maier C.S.; Stevens, J.F. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. Food Chemistry. 192:156–162.

Williams A., Noble J., Tammam J., Lloyd D. & Banks J. (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.

Winnifrith J. (1962). The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Allen & Unwin. 11th edición. Sydney AUS. 271p.

Wongputtisin P., Khanongnuch C., Pongpiachan P. & Lumyong S. (2007). Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation. Research Journal of Microbiology. 2: 577-583.

Wu J., Aluko R., & Muir A. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions, Journal of Chromatography. 950(1): 125-130.

Yang W., Wang Z. & Xu S. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. Chinese Chemical Letters. 18: 449-451.

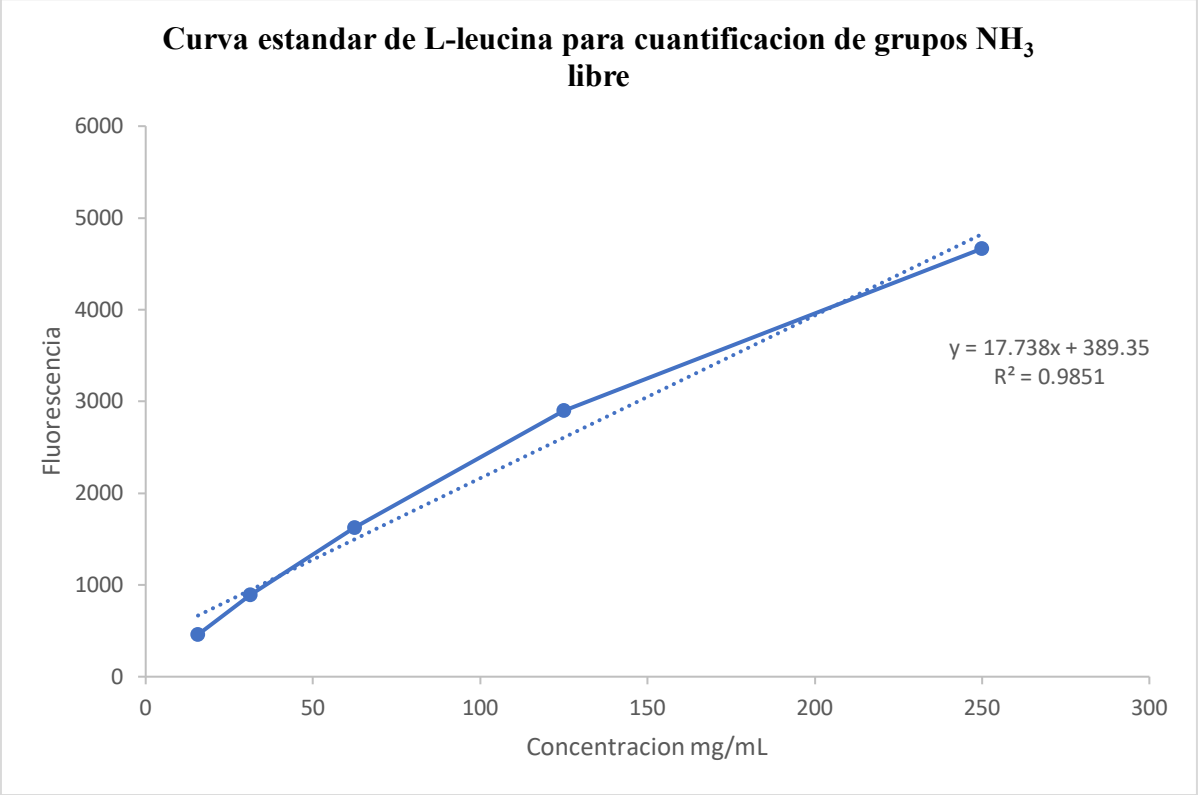
Yin S., Tang C., Cao J., Hu E., Wen Q. & Yang X. (2008). Effects oflimited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) proteinisolate. Food Chemistry. 106(3): 1004-13.

Zhang J., Zhang H. & Wang L. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. Food chemistry. 119(1): 226-234.

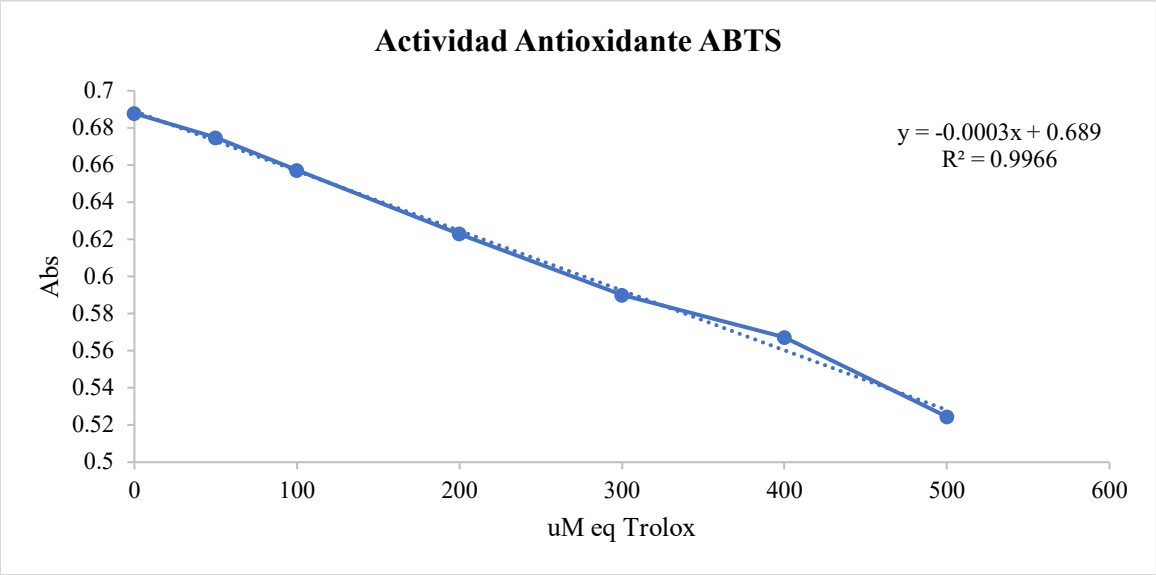
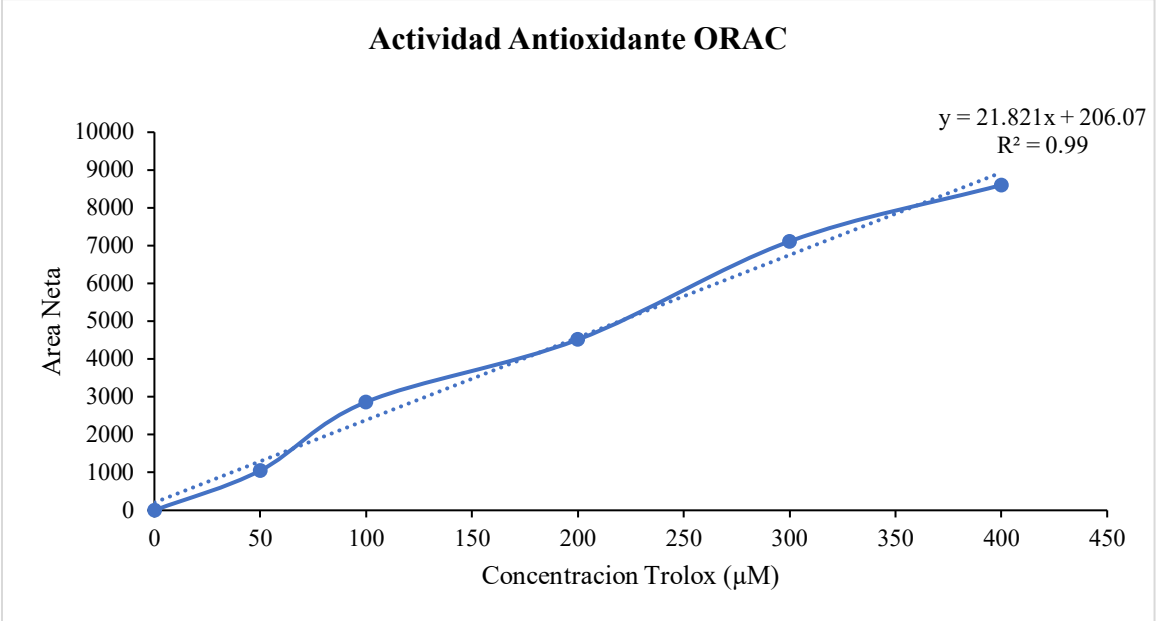
Zulueta A., Maurizi A., Frígola A., Esteve M.J., Coli R. & Burini G. (2009). Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. International Dairy Journal. 19:380–385.

8. ANEXOS

8.1. Curva Estándar Actividad Proteolítica



8.2. Curva Estándar Trolox ABTS



8.3. Curva Estándar Trolox ORAC