

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS, CON ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA E HIPOGLUCEMIANTE *in vitro*, A PARTIR DEL TARWI (*Lupinus mutabilis*)”

Presentada por:

NAYSHA VILLASANTE BRAVO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO

MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS













Lima - Perú

2022

Document Information

Analyzed document	TESIS VILLASANTE-MTAL_FINAL.docx (D149812950)
Submitted	11/15/2022 11:05:00 PM
Submitted by	Rosana Chirinos
Submitter email	chiri@lamolina.edu.pe
Similarity	18%
Analysis address	chiri.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/UNALM/3296/3/ochoa-pachas-karina-guadalupe.pdf Fetched: 7/26/2021 6:36:22 AM	 83
SA	Beneto.pdf Document Beneto.pdf (D24945682)	 2
SA	1561464272_789__BONILLA_PALMA_VERA_Ensayo1P_QAL.docx Document 1561464272_789__BONILLA_PALMA_VERA_Ensayo1P_QAL.docx (D54481479)	 2
SA	Proyecto_QSAR_Aporte Senecyt-UDA.doc Document Proyecto_QSAR_Aporte Senecyt-UDA.doc (D10494977)	 1
SA	Tesis Final Alisson Arellano 040222 urkund.pdf Document Tesis Final Alisson Arellano 040222 urkund.pdf (D127112389)	 2
SA	Poveda et al. (2017)_Enfoque UTE_v0.docx Document Poveda et al. (2017)_Enfoque UTE_v0.docx (D30226470)	 2
SA	084cefadd6dba076359b07ebcc5e13f73cee8288.html Document 084cefadd6dba076359b07ebcc5e13f73cee8288.html (D121991652)	 2
SA	submission.pdf Document submission.pdf (D110252923)	 1
SA	leon_silvia_tefg_uvo.docx Document leon_silvia_tefg_uvo.docx (D19196749)	 1
SA	1469677047_304__resumen_critico_karina_marin.pdf Document 1469677047_304__resumen_critico_karina_marin.pdf (D21233454)	 1
SA	MONT_SÍLVIA. TFG.pdf Document MONT_SÍLVIA. TFG.pdf (D109766748)	 1
SA	GARCIA_SILVANA ARELY.pdf Document GARCIA_SILVANA ARELY.pdf (D74984657)	 2

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS, CON
ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA E
HIPOGLUCEMIANTE *in vitro*, A PARTIR DEL TARWI
(*Lupinus mutabilis*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

NAYSHA VILLASANTE BRAVO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Bettit Salvá Ruiz
PRESIDENTE

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
ASESOR

Dra. Ana Aguilar Galvez
CO-ASESOR

Dr. Eduardo Morales Soriano
MIEMBRO

Mg.Sc. Elva Ríos Ríos
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mi madre.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora, la Dra. Rosana Chirinos, por la oportunidad de permitirme formar parte de la línea de investigación de *Lupinus mutabilis*, el patrocinio brindado, su gran paciencia, sus enseñanzas y apoyo constante en el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A mi co-asesora, la Dra. Ana Aguilar, por su gran fomento en la parte experimental, sus enseñanzas y, sobre todo, buenos consejos, con el fin de culminar el presente trabajo de manera satisfactoria.

Al Dr. David Campos, por la oportunidad de haberme permitido desarrollar la presente investigación, así como también, por sus enseñanzas y, sobre todo, su gran respaldo en la parte experimental.

A Adelaida Pardo, por su imprescindible apoyo en la parte experimental de la investigación, por alegrar las tardes con su gran sentido del humor, así mismo, mantener la calma y buscar siempre soluciones a los distintos problemas en laboratorio y, sobre todo, por compartir momentos muy gratos junto a amigos del IBT.

A mis compañeros tesisistas del IBT, por sus buenos consejos y compartir momentos agradables.

Al Proyecto Concytec - Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora Fondecyt, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto de Contrato N° 66-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV titulado: "Producción de péptidos bioactivos por biotransformación enzimática de la proteína del tarwi (*Lupinus mutabilis*), su caracterización química y de funcionalidad utilizando como herramientas a la peptidómica y ensayos bioquímicos".

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 GENERALIDADES SOBRE EL TARWI	3
2.2 VALOR NUTRICIONAL DEL TARWI	4
2.3 USOS DEL GRANO DE TARWI.....	6
2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS	6
2.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS	7
2.5.1 PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	7
2.5.2 PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	9
2.5.3 PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE.....	11
2.6 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	12
2.6.1 ULTRAFILTRACIÓN	12
2.6.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS EMPLEADAS EN PROTEÍNAS.....	14
2.6.3 ELECTROFORESIS	17
III. METODOLOGÍA	22
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	22
3.2 MATERIA PRIMA.....	22
3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	22
3.3.1 MATERIALES	22

3.3.2 EQUIPOS	23
3.3.3 REACTIVOS.....	24
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	25
3.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE...25	
3.4.2 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	26
3.4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS....26	
3.4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....27	
3.4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE.....28	
3.4.6 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES IC ₅₀	29
3.4.7 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	29
3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
3.5.1 SEPARACIÓN POR MEMBRANAS: ULTRAFILTRACIÓN	31
3.5.2 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN: FILTRACIÓN EN GEL	32
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI.....	35
4.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS.....	38
4.2.1 PURIFICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE TARWI POR ULTRAFILTRACIÓN	38
4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL	43

4.2.3 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	49
V. CONCLUSIONES	53
VI. RECOMENDACIONES.....	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII. ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de los perfiles de aminoácidos esenciales (+ cistina) de cuatro especies de tarwi y soja (<i>Glycine max</i>).....	5
Tabla 2: Composición nutricional (g/100 g, b.s.) de cuatro especies de <i>Lupinus</i> en comparación con la soja (<i>Glycine max</i>)	5
Tabla 3: Tipos de cromatografía empleados en la separación de proteínas.	15
Tabla 4: Diseño experimental para la purificación de péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante del tarwi.....	34
Tabla 5: Grado de hidrólisis, actividad antioxidante, inhibición de la ECA y DPP-IV y sus respectivos valores de IC₅₀ del hidrolizado proteico de tarwi	35
Tabla 6: Actividad antioxidante (μmol TE/mg proteína), inhibición de la actividad ECA - I (%) y DPP-IV (%) y valores de IC₅₀ para el hidrolizado proteico de tarwi y los permeados obtenidos luego del proceso de ultrafiltración*	39
Tabla 7: Características, de las fracciones obtenidas durante el proceso de cromatografía de filtración en gel (Biogel P-2)*	44
Tabla 8: Resumen del proceso de purificación del hidrolizada proteico de tarwi*.....	48
Tabla 9: Pesos moleculares de las fracciones obtenidas del proceso de purificación del hidrolizado proteico de tarwi.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Daño a las moléculas biológicas por las especies de oxígeno reactivas que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.	8
Figura 2: Sistema Renina-Angiotensina.	10
Figura 3: Los péptidos bioactivos tienen acciones antidiabéticas actuando como inhibidores de la α-amilasa y la α-glucosidasa, los agonistas de los receptores GLP-1 y los inhibidores de la DPP-IV.	12
Figura 4: Proceso de ultrafiltración.	13
Figura 5: Cromatografía de exclusión por tamaño. Las moléculas de alto peso molecular son eluidas en el V_0 y las moléculas de bajo peso molecular son eluidas en el V_t. Las moléculas dentro del rango de separación de la matriz porosa son fraccionadas y excluidas en el V_e (entre V_0 y V_t).	16
Figura 6: Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida. El tratamiento de las muestras con agentes desnaturalizantes provoca la desnaturalización de las proteínas, pérdida de la estructura secundaria y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis.	20
Figura 7: Cromatograma de la separación mediante cromatografía de filtración en gel del permeado de 3kDa obtenido a partir del hidrolizado proteico de tarwi.	43
Figura 8: Perfil electroforético de las fracciones obtenidas del proceso de purificación del hidrolizado proteico de tarwi.	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Curva estándar de proteína soluble.....	75
Anexo 2: Curva estándar de leucina para la determinación de grado de hidrólisis	76
Anexo 3: Curva estándar de actividad antioxidante ABTS.....	77
Anexo 4: Anova simple –actividad antioxidante por cut off.....	78
Anexo 5: Anova simple – inhibición de la ECA-I (%) a concentracion 0.75 mg/ml por cut off	79
Anexo 6: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) por cut off.....	80
Anexo 7: Anova simple – inhibición de DPP-IV (%) a concentracion 3 mg/ml por cut off.....	81
Anexo 8: Anova simple – valor IC₅₀- DPP-IV (mg/ml) por cut off	82
Anexo 9: Anova simple –actividad antioxidante por picos	83
Anexo 10: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) por picos	84
Anexo 11: Anova simple – valor IC₅₀- DPP-IV (mg/ml) por picos.....	85
Anexo 12: Anova simple – actividad antioxidante de las etapas de purificación	86
Anexo 13: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) de las etapas de purificación	87
Anexo 14: Anova simple – valor IC₅₀- DPP-IV (mg/ml) de las etapas de purificación	88
Anexo 15: Abreviaturas de nombres, pI y masa de aminoácidos	89

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo concentrar y purificar a los péptidos de un hidrolizado proteico de tarwi (HPT), mediante técnicas de ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel, en función a su actividad antioxidante (AA) y propiedades antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I, ECA) e hipoglucemiante (inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV, DPP-IV) a través de la medida del valor de su IC₅₀, así como su caracterización a nivel de peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE. El hidrolizado fue obtenido a partir de la hidrólisis en dos etapas de la proteína del tarwi con las enzimas Alcalasa (60 min) seguido de Neutrasa (180 min) a 50 °C. El HPT luego de pasar por ultrafiltración empleando membranas de *cut off* de 10 y 3 kDa, dio por resultado un permeado < 3 kDa con valores de AA de 1.89 µmol TE/mg proteína y valores IC₅₀ para la ECA y DPP-IV de 0.11 mg/mL y 3.71 mg/mL, respectivamente. El permeado al pasar por cromatografía de filtración en gel, utilizando Biogel P-2, fue dividido en un total de cuatro fracciones (F I - F IV), donde la última fracción (F IV) exhibió la más alta AA (6.41 µmol TE/g proteína) y bajo valor IC₅₀ para la ECA y DPP-IV (0.06 y 0.32 mg/mL, respectivamente). Luego de la electroforesis, los péptidos que conforman las dos últimas fracciones; F III y F IV, mostraron rangos de pesos moleculares, que oscilaban entre los más bajos, de ~ 15 kDa hasta < 1kDa, lo que justificaría los mejores valores alcanzados en las propiedades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante, evaluadas, resaltando la fracción IV. Los resultados obtenidos indican que el hidrolizado proteico de tarwi evaluado presenta péptidos multifuncionales; en este sentido, puede ser considerado en su forma entera o purificada como un potencial ingrediente natural en la elaboración de alimentos funcionales y/o en nutracéuticos.

Palabras clave: péptidos funcionales, purificación, *L. mutabilis*, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel.

ABSTRACT

The objective of this research was to concentrate and purify the peptides of a tarwi protein hydrolyzate (HPT), employing ultrafiltration techniques and gel filtration chromatography, based on their antioxidant activity (AA) and antihypertensive properties (inhibition of the enzyme converting angiotensin I, ACE) and hypoglycemic (inhibition of the enzyme dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV) through the measurement of its IC₅₀ value, as well as its characterization at the molecular weight level employing SDS-PAGE electrophoresis. The hydrolyzate was obtained from the hydrolysis in two stages of the tarwi protein with the enzymes Alcalase (60 min) followed by Neutrase (180 min) at 50 °C. HPT after ultrafiltration using 10 and 3 kDa cut-off membranes, resulted in a permeate < 3 kDa with AA values of 1.89 µmol TE/mg protein and IC₅₀ values for ACE and DPP-IV of 0.11 mg/ mL and 3.71 mg/mL, respectively. The permeate passing through gel filtration chromatography, using Biogel P-2, was divided into a total of four fractions (F I - F IV), where the last fraction (F IV) exhibited the highest AA (6.41 µmol TE/ g protein) and low IC₅₀ value for ACE and DPP-IV (0.06 and 0.32 mg/mL, respectively). After electrophoresis, the peptides that make up the last two fractions; F III and F IV, showed molecular weight ranges, which ranged from the lowest, from ~ 15 kDa to < 1kDa, which would justify the best values achieved in the antioxidant, antihypertensive and hypoglycemic properties, evaluated, highlighting fraction IV. The results obtained indicate that the evaluated tarwi protein hydrolyzate has multifunctional peptides, and can be considered in its whole or purified form as a potential natural ingredient in the production of functional foods and/or nutraceuticals.

Keywords: functional peptides, purification, *L. mutabilis*, ultrafiltration, gel filtration chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

El tarwi, es una leguminosa perteneciente a la familia de las fabáceas reconocido por su elevado contenido de proteínas y aceite (Campos *et al.* 2018). En las zonas andinas de Perú, Ecuador y Bolivia, la producción nacional anual de tarwi en toneladas por hectárea es de 0.40, 0.65 y 1.33 respectivamente (Rojas 2016; Mazón 2018) constituyendo una de las principales fuentes de alimentación e ingresos de las poblaciones andinas (Tapia 2015). En el Perú, las principales regiones cosechadas de tarwi, son La Libertad, Cusco, Puno y Apurímac, con 3 478, 2 557, 1 070 y 810 hectáreas respectivamente (De la Cruz 2018). Las especies más cultivadas de *Lupinus* a nivel mundial son *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus mutabilis*, siendo esta última especie, nativa de los Andes de América del Sur que, a su vez, se encuentra aún en proceso de inserción en el mercado europeo (Lucas *et al.* 2015). Así mismo, *L. mutabilis* se caracteriza por la mayor calidad de grano de todos los lupinos cultivados y posee la facilidad de adaptación a la agricultura de bajos insumos en climas templados y fríos, de ahí que la combinación de estas características hace de *L. mutabilis* una alternativa potencialmente superior a las actuales fuentes vegetales de proteína y aceite en América del Sur, Europa y otras regiones con climas templados (Gulisano *et al.* 2019)

De otro lado, hoy en día las proteínas alimenticias, procedentes de leguminosas se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o tecno-funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos funcionales. Es así que, diversos estudios describen la obtención, purificación y caracterización de péptidos provenientes de proteínas de fuentes de origen vegetal, a quienes se les ha evaluado diferentes propiedades bioactivas tales como: antihipertensiva, antioxidante, hipocolesterolémica, anticancerígena, inmunomoduladora, antiinflamatoria, entre otros (Borja 2014).

En la búsqueda de fuentes proteicas vegetales de nuestra biodiversidad se eligió al tarwi, para el desarrollo de la presente investigación, sustentado en su alto contenido proteico como un potencial insumo para la obtención de péptidos bioactivos. En una investigación previa realizada por Chirinos *et al.* (2020) encontraron que la hidrólisis de la proteína de tarwi conducida en dos etapas secuenciales con las enzimas Alcalasa-Neutrasa por 180 min a 50 °C logró producir hidrolizados proteicos multifuncionales con propiedades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante evaluadas *in vitro*. Es así como, la presente investigación, parte del estudio previo citado y tiene como objetivo definir una estrategia de purificación de los péptidos, presentes en el hidrolizado proteico de tarwi, empleando técnicas como la filtración por membrana (ultrafiltración) y la cromatografía de filtración en gel, con el fin de concentrar y evaluar en las fracciones de péptidos resultantes; las propiedades bioactivas (antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante *in vitro*) y un perfil electroforético SDS-PAGE con la finalidad de estimar el rango de peso molecular de los péptidos constituyentes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL TARWI

La diversidad de los cultivos andinos ha permitido que varias culturas y sociedades puedan establecerse y con ello domesticar y desarrollar cultivos para su sustento. Uno de los cultivos más notorios es el de chocho andino (*L. mutabilis*: Fabaceae) conocido también como tarwi. El género se originó en la región andina de Ecuador, Perú y Bolivia, estas áreas poseen diversas variedades de especies de *Lupinus*, así en la región andina se han identificado 83 especies (Jacobsen y Mujica 2006).

En el Perú se cultivan diversas especies de granos andinos como la quinua, kiwicha, cañihua y el tarwi, entre otros. En el año 2017, la superficie cosechada de estos granos andinos alcanzó en conjunto ~ 79 mil hectáreas, con una producción total de ~ 100 toneladas; siendo la sierra la principal zona productora, destacando las regiones de Puno, Ayacucho, Cusco, Arequipa, Apurímac y Ancash (Montero 2018). Con respecto al tarwi, las regiones con mejor desempeño son La Libertad, Cusco y Puno, representando en promedio el 78 por ciento de la producción del tarwi a nivel nacional.

El tarwi se puede cultivar sobre los 2,200 m.s.n.m. en adelante y es muy resistente a distintas plagas. El suministro de agua o de cuidados especiales no es indispensable para su cultivo siendo esta una de sus características más importantes con respecto al cambio climático, oscilaciones de temperaturas y escasez de agua (Cañahua y Mujica 2014). Desde el punto de vista de la producción ecológica, el cultivo de tarwi es muy beneficioso para el sistema productivo de la sierra, sus raíces fijan el nitrógeno atmosférico y por lo tanto contribuyen a mejorar la fertilidad del suelo, ya que el nitrógeno incorporado al suelo es equivalente de 150 a 300 unidades, que en términos económicos sería como aportar de 7 a 10 sacos de urea por hectárea, lo cual representa un aporte muy importante a los ingresos de los pequeños agricultores (Canahua y Roman 2016). El tarwi forma parte de los sistemas tradicionales de rotación de cultivos del Altiplano Norte, entre ellos: quinua-lupino- papa, quinua-lupino-

cebada o quinua-lupino-quinua (Jacobsen y Mujica 2006) sin uso de ningún otro fertilizante. En congruencia, Canelo *et al.* (2009) indican que el cultivo de tarwi aumenta la productividad de otros cultivos como la papa, el maíz y con aumento de demanda por parte del consumidor.

La clasificación taxonómica según Borja (2014), es la siguiente:

Reino : Vegetal
División : Fanerógama
Clase : Dicotiledónea
Orden : Fabales
Familia : Fabaceae
Tribu : Genisteas
Género : *Lupinus*
Especie : *Lupinus mutabilis*
Nombre común : Tarwi

El tarwi posee una alta variabilidad genética, evidenciada en el alto nivel de polimorfismo, siendo una especie autógama con un predominante grado de alogamia, lo cual ayudaría al mejoramiento genético, por ejemplo, incrementando el rendimiento del cultivo especialmente en la producción de semillas, mejorando la adaptación de la planta a diferentes tipos de clima y cosechando semillas de calidad óptima para el consumo humano directo, etc. (Chirinos-Arias 2015).

2.2 VALOR NUTRICIONAL DEL TARWI

Las semillas de *L. mutabilis* se caracterizan por un alto contenido de proteína y aceite con un 44 y 18 por ciento en base seca (b.s.), respectivamente, que supera al de cualquier otra especie de lupino (Blanco-Galdos 1982; Pate *et al.* 1985). Además, las semillas de lupino prácticamente carecen de almidón, los principales carbohidratos que se encuentran son los oligosacáridos (estaquiosa y rafinosa) y los polisacáridos de almacenamiento de la pared celular (Trugo *et al.* 2003). La mayoría de los aminoácidos esenciales, la lisina en particular,

están presentes en las semillas de tarwi (Tabla 1) junto a una cantidad sustancial de fibra dietética y ácidos grasos (Tabla 2) (Carvajal-Larenas *et al.* 2016).

Tabla 1: Comparación de los perfiles de aminoácidos esenciales (más cistina) de cuatro especies de tarwi y soja (*Glycine max*).

	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. luteus</i>	<i>Glycine max</i>
Histidina	3.5	2.6	2.0	3.1	3.8
Isoleucina	4.2	4.0	4.1	3.6	n.d.
Leucina	7.0	6.9	6.8	7.8	7.2
Lisina	5.8	4.6	4.5	4.5	5.4
Metionina	0.8	0.7	0.7	0.6	1.2
Fenilalanina	3.5	3.7	3.4	3.7	4.9
Treonina	3.5	3.4	3.4	3.0	5.4
Triptófano	0.8	0.9	0.9	0.9	n.d.
Valina	3.8	3.7	3.8	3.4	4.9
Cistina*	1.6	1.6	1.5	2.4	1.5

Los datos se expresan en g/100 g de proteínas (b.s). *Equivalente a 3.168 g/100 g cisteína. n.d: datos no disponibles.

Fuente: Carvajal-Larenas *et al.* (2016); Prakash y Misra (1988).

Tabla 2: Composición nutricional (g/100 g, b.s.) de cuatro especies de Lupinus en comparación con la soja (*Glycine max*)

Especie	Proteína cruda	Lípidos crudos	Fibra cruda	C18:1 (oleico)	C18:2 (linoleico)	C18:3 (linolénico)	C22:1 (erúcico)
<i>L. mutabilis</i>	43.3	18.9	8.2	46.4	33.1	2.5	n.d.
<i>L. albus</i>	38.2	11.2	8.9	54	18.7	8.6	0.4 - 2.7
<i>L. lúteo</i>	42.2	5.5	15.8	28.5	48.2	6.3	Tr - 1.5
<i>L. angustifolius</i>	33.9	6.3	16.0	33.9	40.3	5.6	0.1 - 0.5
<i>Glycine max</i>	42.9	19.8	5.1	22.8	50.8	5.9-8.3	n.d.

Los datos están expresados en g/100 g peso seco. Fibra cruda: residuo insoluble, compuesta principalmente de celulosa y lignina. Tr: en trazas, menos de 0.1%. n.d: datos no disponibles.

Fuente: Collins y Howell 1957; Hudson *et al.* 1983; Prakash y Misra 1988; Sharma *et al.* 2014; Carvajal-Larenas *et al.* 2016.

2.3 USOS DEL GRANO DE TARWI

L. mutabilis surge como un alimento para la salud humana y un aditivo alimentario. Jacobs y Mujica (2006) mencionan que para el consumo de tarwi en la alimentación humana, se debe realizar una previa eliminación del sabor amargo, a causa de la presencia de alcaloides, los métodos de desamargado, generalmente usan tratamientos con agua, sal, cal y ceniza.

Pérez (2019) resalta que la harina de tarwi es usada en un 15 por ciento en la panificación con excelentes resultados por el contenido de proteínas y grasas, ya que posee la ventaja de mejorar considerablemente el valor proteico y calórico del producto. Asimismo, permite una conservación más prolongada del pan, debido a la retrogradación del almidón, obteniendo un mayor volumen por las propiedades emulgentes que tiene la lecitina del tarwi.

En la región andina se utilizan tradicionalmente en sopas, guisos y ensaladas, también como materia prima para producir harina, leche y margarina (Falconí 2012). Por otra parte, la harina de tarwi, el concentrado de proteína y el aislado de proteína presentan propiedades físicas y funcionales muy valiosas para el sector alimentario y químico (Carvajal-Larenas *et al.* 2016). Estos derivados se pueden utilizar como base para alternativas o sustitutos de la carne o huevo, mejorador del pan, emulsionante y para aumentar el contenido de nutrientes de muchos productos (Gulisano *et al.* 2019). Después de la extracción de proteínas, la gran cantidad de fibra dietética todavía disponible (hasta el 40 por ciento de la masa de semillas) puede encontrar aplicación como prebiótico e ingrediente alimenticio para ser empleado en la fabricación de productos horneados enriquecidos con fibra (Clark y Johnson 2002; Smith *et al.* 2006). El aceite, caracterizado por un alto valor nutricional, también representa un producto atractivo tanto para fines nutraceuticos como cosméticos, además, también se han descrito usos farmacéuticos, por ejemplo, en *L. mutabilis* se ha encontrado que su ingesta reduce los niveles de glucosa en sangre, lo que representa una alternativa válida para el tratamiento de enfermedades hiperglucémicas (Fornasini *et al.* 2012).

2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los péptidos bioactivos son fracciones proteicas, que se obtienen a partir de proteínas alimentarias de origen animal, vegetal o microbiana, por medio de diferentes procesos como

la fermentación, hidrólisis química o enzimática y digestión gastrointestinal simulado. Vioque y Millán (2005), señalan que los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos, con número entre dos a quince aminoácidos, los que están de forma inactiva dentro de la proteína precursora; sin embargo, pueden activarse al ser liberados durante de la digestión en el organismo del individuo o por un proceso de hidrólisis. Una vez liberados, los péptidos pueden ser absorbidos por los enterocitos y alcanzar el torrente sanguíneo desempeñando un efecto funcional más allá de aportar solo aminoácidos esenciales al metabolismo energético (Hartmann y Meisel 2007) como, efectos antioxidantes, antihipertensivos, hipoglucemiante, opiáceo, fijador de minerales, antimicrobiano, inmunomodulador, entre otros.

Respecto a péptidos reportados en la especie *Lupinus*, estudios indican que péptidos bioactivos procedentes del *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. campestris* y *L. luteus* presentan propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas (Del Carmen Millán-Linares *et al.* 2014). Asimismo, la hidrólisis de la proteína del *L. luteus* ha mostrado actividad inhibitoria frente a la enzima angiotensina I (ECA), presentando una alternativa en el manejo de la hipertensión (Boschin *et al.* 2014).

Actualmente la tendencia en investigación acerca de la liberación de péptidos bioactivos y la búsqueda de propiedades nutricionales en alimentos va en aumento, con ello también la posibilidad de utilizar péptidos como ingredientes funcionales tanto para la industria alimentaria como para la farmacológica (Vercruyssen *et al.* 2005).

2.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS

2.5.1 Péptidos con actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), se generan constantemente en los organismos aerobios como resultado de las reacciones metabólicas. El exceso de las ERO puede causar estrés oxidativo y daños en las membranas celulares, las proteínas y el ADN, conduciendo al desarrollo de enfermedades crónicas (Yongvanit *et al.* 2012) (Figura 1). En circunstancias normales, el organismo tiene la capacidad de eliminar los radicales libres endógenos; sin embargo, cuando el metabolismo está desordenado o atascado por radicales libres exógenos a causa del estrés, tabaco, contaminación, etc., el equilibrio entre los antioxidantes endógenos y los radicales libres podría romperse (Yang *et al.* 2018). Para contrarrestar estos

mecanismos de desequilibrio en el cuerpo humano, los péptidos antioxidantes procedentes de los sistemas alimenticios, contribuyen a mejorar la defensa antioxidante celular y reducen la lesión oxidativa de tejidos y órganos mediada por las ERO (Guo *et al.* 2015). Así mismo, se usan comúnmente para prevenir el deterioro de la calidad inducido por la peroxidación de lípidos, inhibir la producción de sustancias potencialmente tóxicas y prolongar la vida útil de los productos alimenticios (Harnedy y FitzGerald 2012).

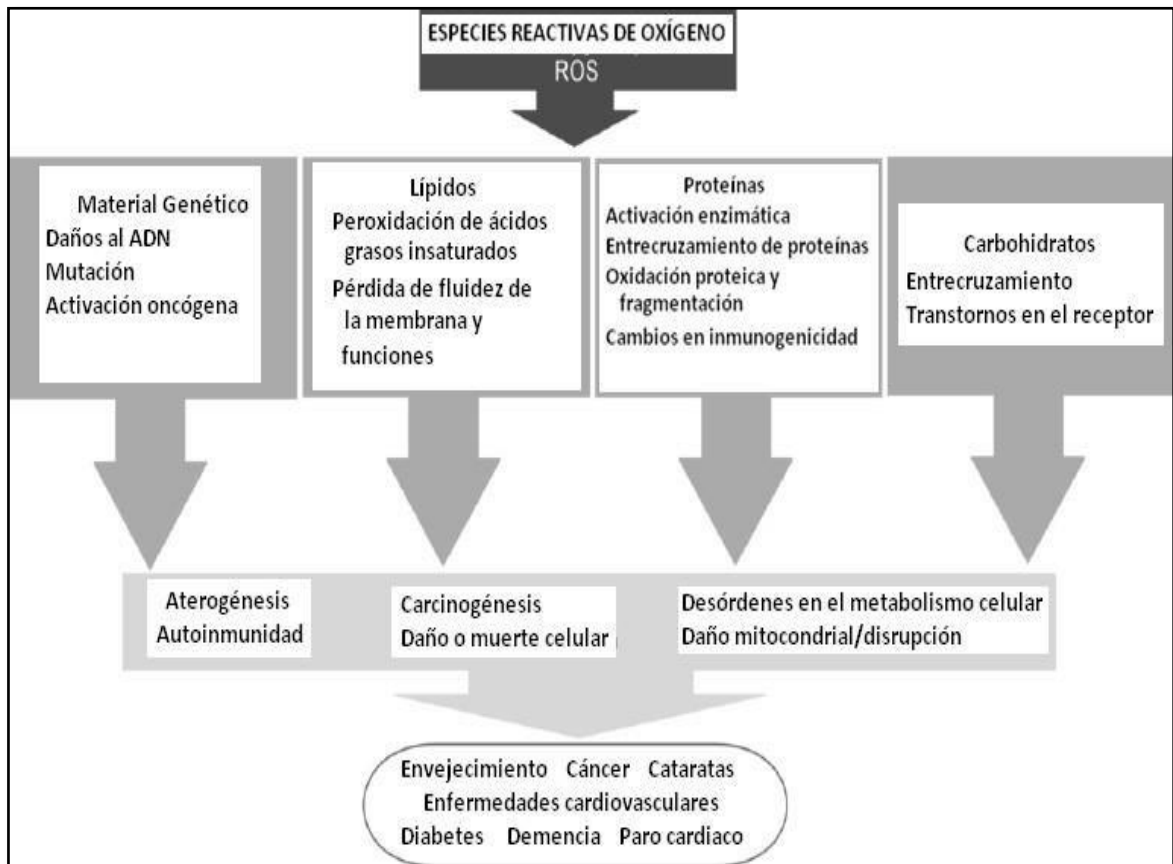


Figura 1: Daño a las moléculas biológicas por las especies de oxígeno reactivas que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.

Fuente: Ojiugo (2014)

Además, Segura-Campos *et al.* (2013) señalan que, las secuencias peptídicas antioxidantes de interés podrían presentar efectos sinérgicos o antagónicos con otros antioxidantes y/o metales traza presentes en el alimento, así como en sistemas biológicos e incluso podrían actuar como pro-oxidantes bajo ciertas condiciones, por lo que estos factores deberían ser considerados cuidadosamente para posibles aplicaciones. Los péptidos puros aislados

comparados con los extractos que contienen péptidos crudos o semipurificados son más factibles para su empleo en productos alimenticios.

Estudios han reportado que la actividad antioxidante de hidrolizados de proteína y péptidos aislados y preparados de fuentes naturales, en algunos casos es similar o mayor que antioxidantes sintéticos como BHA, BHT y propilgalato. Además de sus actividades antioxidantes, los hidrolizados de proteínas han demostrado propiedades funcionales interesantes, como una alta solubilidad, lo que resulta en aumentos en la concentración de grupos amino y carboxilo libres (Borja 2014).

Como ejemplos de péptidos antioxidantes tenemos el péptido PSELSGAAH (Pro-Ser-Glu-Ile-Ser-Gly-Ala-Ala-His) reportado por Muñoz *et al.* (2018) a partir de la hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina de *L. mutabilis*. Así mismo en *L. albus*, Babini *et al.* (2017) encontraron el péptido antioxidante FVPY (Phe-Val-Pro-Tyr), a partir del hidrolizado enzimático conducido con Neutrasa.

Desde la perspectiva de la nutrición humana, cada vez más investigaciones se dedican a explorar los antioxidantes naturales, entre ellos los péptidos, con beneficios para la salud y con pocos o ningún efecto secundario (Guo *et al.* 2015).

2.5.2 Péptidos con actividad antihipertensiva

La hipertensión es una enfermedad crónica común, es el factor de riesgo más importante de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares en los países industrializados (Daliri *et al.* 2018; Ugwu *et al.* 2019). Los pacientes a menudo no tienen síntomas evidentes en la etapa inicial y si no se tratan adecuadamente, se provocará un accidente cerebrovascular y, finalmente, la muerte (Bhaskar *et al.* 2019). En este sentido, a fin de la prevención, el mecanismo antihipertensivo más estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA).

El sistema renina-angiotensina (SRA) ha jugado un papel importante en la regulación de la presión arterial, basado en las actividades catalíticas de las enzimas involucradas (Onuh *et al.* 2015), como la renina y la ECA. La renina es producida principalmente por los riñones y convierte el angiotensinógeno en angiotensina-I, que es el paso determinante de la velocidad

en la cascada SRA (Aluko 2019). Con respecto a la ECA, Zhang *et al.* (2018) menciona que presenta dos funciones principales: la primera es la conversión de angiotensina-I en angiotensina-II. La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua que provoca el incremento del volumen extracelular y la neutralización de la producción de renina (Borja 2014). Como segunda función, la ECA inactiva a la bradiquinina (un vasodilatador), lo que finalmente conduce a un aumento de la presión arterial (Malomo *et al.* 2015; Shabestarian *et al.* 2017) (Figura 2).

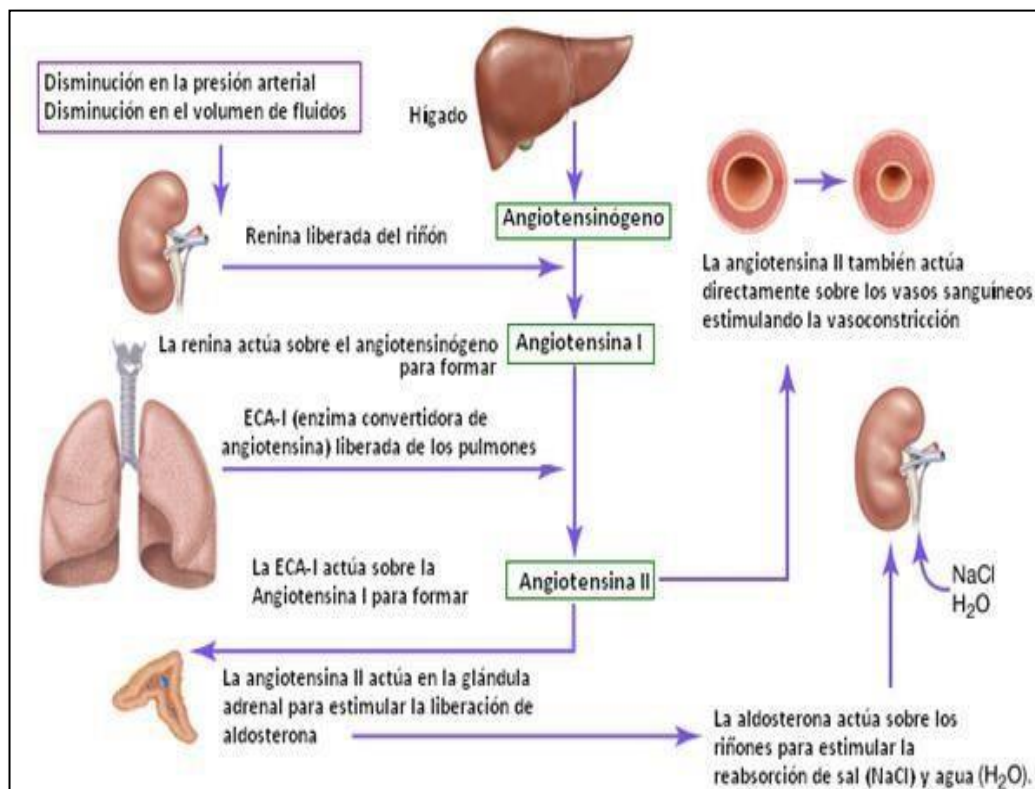


Figura 2: Sistema Renina-Angiotensina.

Fuente: Adaptado por Ochoa (2018) de Encyclopædia Britannica (2017)

Como ejemplos de péptido A antihipertensivos reportados tenemos el péptido Tyr-Ser-Lys, reportado por Wang *et al.* (2017) a partir del hidrolizado enzimático conducido por Tripsina de proteínas del salvado de arroz. Así mismo, a través de la hidrólisis de la microalga

Chlorella vulgaris utilizando Alcalasa, se separó un péptido inhibidor de la ECA con una secuencia de aminoácidos de Ile-Gln-Pro (Lu *et al.* 2010).

2.5.3 Péptidos con actividad hipoglucemiante

La hiperglicemia post-prandial es una de las primeras anormalidades detectables en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) así como la responsable de inducir el estrés oxidativo que se reconoce como un vínculo fisiopatológico entre las enfermedades cardiovasculares (ECV) y la diabetes (Raju *et al.* 2010). Por lo tanto, una elección para pacientes con diabetes es, reducir la absorción de carbohidratos para su posterior hidrólisis en azúcares empleando inhibidores de α -glucosidasa, α -amilasa y la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Es así como los péptidos hipoglucemiantes, provenientes de sistemas alimentarios, son una alternativa de prevención natural a dichas enfermedades, ya que actúan como inhibidores enzimáticos de las diferentes enzimas involucradas en el mecanismo de la absorción de azúcares hacia el torrente sanguíneo (Figura 3)

La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una nueva diana molecular correlacionada con el desarrollo de diabetes tipo 2 (Bailey *et al.* 2016), la inhibición de esta enzima mejora la tolerancia a la glucosa en pacientes diabéticos al aumentar los efectos insulíntrópicos de GLP-1 y reducción de la glucosa en sangre a través de la estimulación de la insulina y la inhibición de glucagón (Ahrén *et al.* 2004). Por esta razón, los inhibidores de la DPP-IV han surgido como una nueva clase de antidiabéticos orales con excelentes potenciales terapéuticos en el manejo de la DM 2 (Bailey *et al.* 2016).

Por otra parte, la actividad hipoglucemiante presentan efectos positivos al reducir niveles de glucosa a través de péptidos inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa, estos efectos han sido encontrados en péptidos provenientes de especies vegetales tales como *Momordica charantia*, *Gymnema silvestre* y *Anemarrhena asphodeloides* (Tránsito-López 2006), así como inhibidores de DPP-IV, en péptidos provenientes de *Amaranthus hypochondriacus* (Velarde-Salcedo *et al.* 2013), soya y lupino (Lammi *et al.* 2016). Es así como, los péptidos hipoglucemiantes provenientes de fuentes vegetales ofrecen una buena estrategia para controlar la hiperglicemia y proporcionar beneficios sin los efectos adversos de los fármacos tales como: hipoglucemia, hepatotoxicidad, acidosis láctica, que propician daños en órganos y

tejidos que inicialmente no fueron afectados, suscitando así una progresión acelerada de la enfermedad (Wan *et al.* 2012).

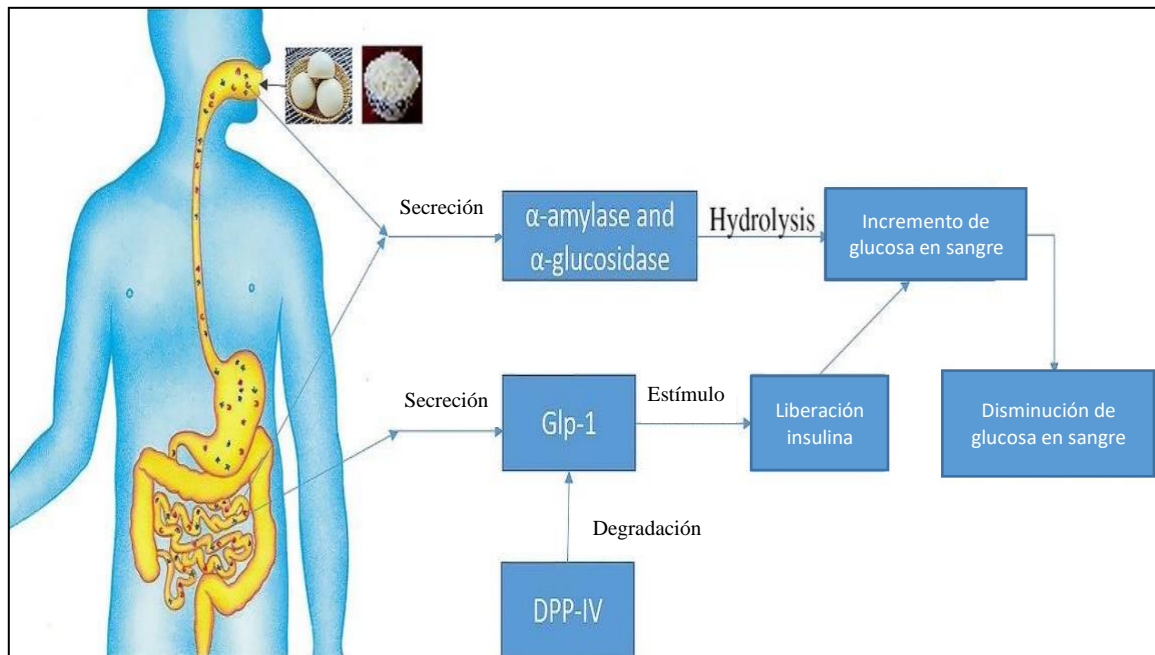


Figura 3: Los péptidos bioactivos tienen acciones antidiabéticas actuando como inhibidores de la α -amilasa y la α -glucosidasa, los agonistas de los receptores GLP-1 y los inhibidores de la DPP-IV.

Fuente: Yan *et al.* (2019).

2.6 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

2.6.1 Ultrafiltración

El proceso de filtración por membrana es un método de separación físico, caracterizado por la capacidad de separar moléculas de diferentes tamaños y características, donde la fuerza motriz es la diferencia de presión entre los dos lados de una membrana selectiva (Salunke *et al.* 2021). Un tipo de filtración de membrana es la ultrafiltración (UF), la separación se realiza mediante la exclusión por tamaño molecular y una gradiente diferencial en la concentración de la muestra (alimentación), donde las moléculas más grandes que el diámetro del poro de la membrana no la atraviesan, denominándose a esta fracción, retentado; en tanto, las moléculas que sí logran atravesar dicho poro se denominan permeado

o percolado (Tavares y Malcata 2016) (Figura 4). Para que estas moléculas logren pasar el diámetro del poro, la fuerza convectiva debe superar la repulsión electrostática y, además, deben presentar menor tamaño que dicho diámetro. Adicionalmente, se reporta que cuando el tamaño de los poros es amplio, la ultrafiltración dependerá solo del tamaño molecular; en tanto, si los poros de la membrana se van tornando más angostos, la separación estará conducida en términos de la solubilidad de los componentes de la alimentación, la hidrofobicidad y la resistencia a la polaridad (Cui 2005; Galanakis 2014).

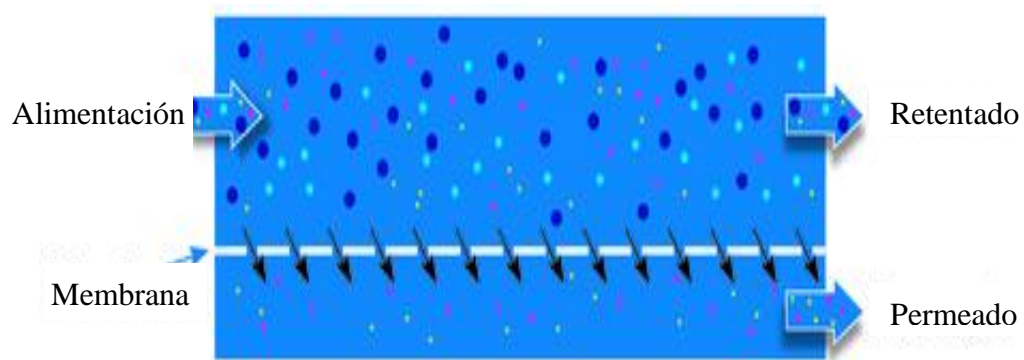


Figura 4: Proceso de ultrafiltración.

Fuente: Alfalaval. Filtración de membrana (Sin año).

El tamaño del poro de la membrana de ultrafiltración fluctúa entre 5-100 nm y retiene moléculas con un peso molecular entre 1 - 100 kDa NMWC (*nominal molecular weight cut off* - límite nominal de peso molecular), motivo por el cual es idealmente usada en macromoléculas como proteínas (Cui 2005; Tavares y Malcata 2016), se usan comúnmente para separaciones biológicas y de proteínas o cambio de buffer (diafiltración) y también a lo largo de los procesos modernos de purificación de proteínas (Janson 2012). Los rangos de *cut off* están relacionados con moléculas globulares, mientras que las moléculas lineales pueden retenerse accidentalmente o no, dependiendo de su orientación relativa a la membrana, es por ello que el uso secuencial de membranas proporciona información de tamaño por etapas (según los rangos de *cut off*) pero puede multiplicar algunos problemas (Fanali *et al.* 2017), el más importante, la pérdida de flujo de permeación causada por el *fouling* debido a la adsorción de moléculas biológicas como las proteínas. El *fouling* en ultrafiltración se define como la acumulación de algunos componentes en la superficie de la

membrana o dentro de los poros de esta (Herrero 2010). Este fenómeno se puede evitar o bien reducir si las interacciones entre el soluto y la superficie de la membrana se minimizan mediante la disminución de la afinidad de la proteína con la membrana, por ejemplo, mediante el control del nivel de pH; sin embargo, cualquier partícula en la muestra puede provocar el *fouling* y su impacto depende de sus características y concentración, así como también de la influencia de las propiedades de la membrana, tales como, el tamaño de poro, la hidrofobicidad, el modo de funcionamiento y el flujo aplicado (Herrero 2010). Por otra parte, este proceso presenta ciertas ventajas en cuanto a su alto rendimiento y a sus condiciones de operación, tales como bajas temperaturas y presiones, la no adición de aditivos químicos; asegurando así un menor riesgo de desnaturalización (en el caso de proteínas) y degradación de productos lábiles (Cui 2005).

En definitiva, esta técnica ha demostrado ser útil para originar fracciones enriquecidas con péptidos bioactivos, con rangos de peso molecular deseados a partir de una amplia gama de hidrolizados de proteínas generando aplicaciones de investigación útiles e innovadoras en el campo de las ciencias de los alimentos (Bouhallab *et al.* 1993). Es así como la UF se aplica comúnmente para preparar soluciones enriquecidas de péptidos a partir de hidrolizados de proteínas para mejorar su bioactividad; empleándose para separar péptidos con un tamaño inferior a 7 kDa (Ramírez 2015). Por ejemplo, se ha logrado gran éxito en la obtención de fracciones abundantes de péptidos con actividad antihipertensiva procedentes de proteínas lácteas (Ramírez 2015), en el fraccionamiento y la caracterización funcional de los hidrolizados de gelatina de calamar o cobia y también como un primer paso en el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos procedentes de colágeno y otras fuentes proteicas (Mosquera 2014).

2.6.2 Técnicas cromatográficas empleadas en proteínas

La cromatografía es un método analítico para la purificación y separación de sustancias orgánicas e inorgánicas que resulta de particular utilidad en el fraccionamiento de mezclas complejas, aislamiento de sustancias inestables y separación de compuestos de estructuras muy semejantes. Este método tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia (Lederer y Lederer 1960; Skoog *et al.* 2008).

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, la cual puede ser un gas, líquido o fluido supercrítico. Esta fase se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan en distinto grado entre la fase móvil y estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil; sin embargo, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa (Skoog *et al.* 2008). En general, una separación cromatográfica depende de la partición diferencial de proteínas entre la fase estacionaria (medio cromatográfico o adsorbente) y la fase móvil (buffer o solvente orgánico). Se emplean varios métodos de cromatografía líquida para la separación de proteínas. Ellos difieren principalmente en el tipo de fase estacionaria empleada, tal como se muestra en la Tabla 3 (Fanali *et al.* 2017).

Tabla 3: Tipos de cromatografía empleados en la separación de proteínas.

Tipo de separación	Tipo de cromatografía
Tamaño y forma	Filtración en gel (FG) / Cromatografía de exclusión por tamaño (CET)
Carga neta	Cromatografía de intercambio iónico
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)/ Cromatografía de fase reversa (CPR)
Función Biológica	Cromatografía de afinidad (CA)
Interacción con ligandos	Cromatografía de pseudoafinidad
Unión de metales	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (CAIM)
Otros	Cromatografía en hidroxapatita (HT/HTP)

Fuente: Fanali *et al.* (2017)

2.6.2.1 Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel se reconoce generalmente como cromatografía de exclusión por tamaño (Size Exclusion Chromatography, CET). Se ha utilizado durante más

de cuatro décadas en la separación, desalinización y estimación del peso molecular de proteínas y sus péptidos (Wang *et al.* 2017).

Para la separación en CET, se utilizan las propiedades de tamiz molecular de una variedad de materiales porosos. El proceso de separación depende del tamaño y el volumen hidrodinámico (volumen que ocupa una molécula en solución), el cual define la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria, de tal forma que, las moléculas de alto peso molecular son excluidas de los poros debido a un efecto estérico y pasan rápidamente a través de la matriz (Figura 5). En el caso de biomoléculas pequeñas, estas tienen diferente accesibilidad en las cavidades de la matriz porosa (Mayolo-DeLoisa *et al.* 2012).

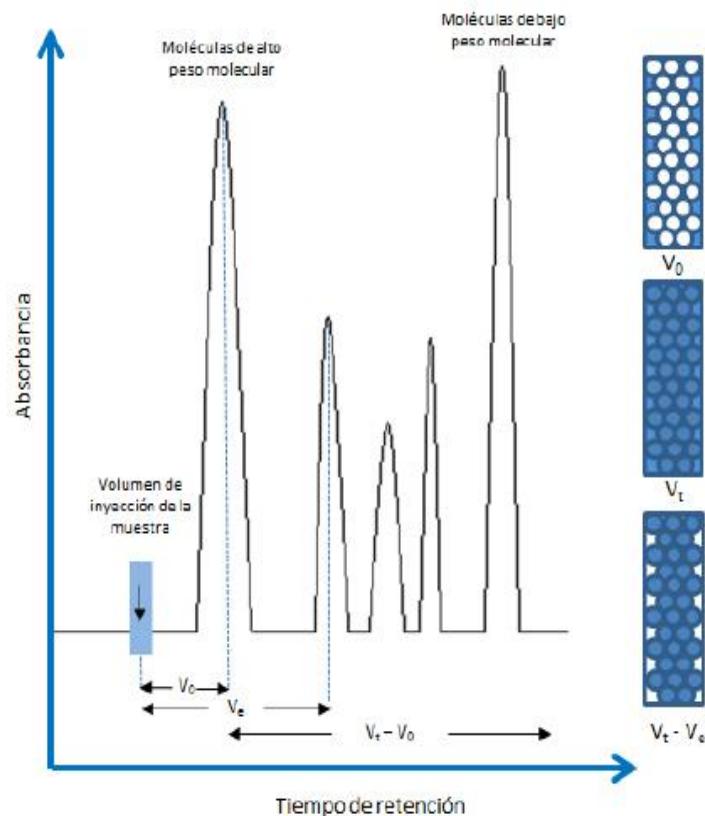


Figura 5: Cromatografía de exclusión por tamaño. Las moléculas de alto peso molecular son eluidas en el V_0 y las moléculas de bajo peso molecular son eluidas en el V_t . Las moléculas dentro del rango de separación de la matriz porosa son fraccionadas y excluidas en el V_e (entre V_0 y V_t).

Fuente: Irvine (1997)

En la Figura 5, se observa que las moléculas que son completamente excluidas eluyen primero V_o (Irvine 1997). El volumen de elución de las moléculas que pueden entrar en los poros libremente es designado como volumen total: V_t . El volumen de elución de una proteína que esta entre V_o y V_t es designado como V_e (Cutler 2008). Esta técnica tiene la ventaja que las condiciones de elución pueden variar con el propósito de adaptarse al tipo de muestra, así como a los requisitos para una mayor purificación, análisis o almacenamiento sin alterar la separación (Shaik y Sarbon 2020).

La purificación por filtración en gel se utiliza para obtener péptidos bioactivos específicos con pesos moleculares y mayor actividad biológica (Shaik y Sarbon 2018). Normalmente, los péptidos parcialmente purificados se someten a cromatografía de filtración en gel. Una de las ventajas significativas asociadas con esta técnica es que la composición del tampón o buffer no tiene impacto en la resolución, ya que las moléculas no se adhieren al medio de cromatografía; además, tiene una alta resolución y alta selectividad, lo que es un paso clave en un proceso de purificación (Shaik y Sarbon 2020). Los medios de cromatografía de filtración en gel se han ampliado a un rango de peso molecular de 100 a 8×10^7 Da, que permite la separación de biomoléculas como péptidos, así como proteínas complejas; sin embargo, la cromatografía de filtración en gel también tiene algunos inconvenientes, por ejemplo, la cantidad de carga se compara rara vez con la filtración por membrana, consume mucho tiempo para la recolección de muestras y tiene costos elevados (Huang *et al.* 2015).

2.6.3 Electroforesis

La electroforesis es una herramienta que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas. La composición del gel electroforético fue en un principio almidón, pero posteriormente se reemplazaron por poliacrilamida, impartiendo a las proteínas una carga negativa, misma que ocasiona que migren al ánodo de un circuito eléctrico. El principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. Cuando una proteína presenta una carga eléctrica neta, en un campo eléctrico se desplazará al electrodo con carga contraria. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración (Pérez *et al.* 2015).

Existen diferentes técnicas y aparatos para el uso de la separación y purificación de proteínas por electroforesis. Sin embargo, la tecnología más utilizada para obtener una separación analítica de alta resolución de mezclas de proteínas es la electroforesis en gel de poliacrilamida, según varios autores (Pérez *et al.* 2015).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se puede llevar a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE) (Maldonado y Jorrín 2010), siendo la más utilizada para obtener una separación analítica de alta resolución de mezclas de proteínas. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) por las siglas en inglés de *Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (Walter 1996), fue desarrollado por Laemmli (1970). Esta técnica utiliza como soporte las placas de poliacrilamida que se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'-metilen bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina). La polimerización depende de la temperatura. Se recomienda utilizar una temperatura por encima de los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. La polimerización se debe realizar en una atmósfera inerte ya que el oxígeno puede actuar como un neutralizador de radicales libres, generados por el ion persulfato, por lo que se deben utilizar cámaras verticales que dispongan de dos placas de vidrios selladas o en tubos para formar geles en disco (Disc gel) y de esta manera disminuir la absorción de oxígeno por los geles (Pérez *et al.* 2015). La velocidad de polimerización está determinada por la concentración de persulfato de amonio y TEMED. Mientras que la porosidad del gel, la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida (C) y bis-acrilamida (T), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10 por ciento. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño (Davis 1964).

Una vez seleccionado el tamaño de poro del gel, el análisis de proteínas continúa con la acción del agente desnaturizante (SDS), este tratamiento en la muestra asegura la desnaturización total de la proteína por pérdida de su estructura. Un tratamiento de la

proteína con 2-mercaptoetanol, a 100°C durante cinco minutos, provoca la reducción de puentes disulfuro y como consecuencia una separación de las cadenas polipeptídicas (Pérez *et al.* 2015). A su vez, la cadena hidrocarbonada hidrófoba del SDS rodeará a las cadenas polipeptídicas, ya separadas, orientando el ion sulfato, hidrofílico, con carga negativa hacia el medio acuoso, de esta manera todas las cadenas polipeptídicas adquieren una carga negativa neta y todas las cadenas polipeptídicas quedan aisladas (Pérez *et al.* 2015) (Figura 6). La migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula, pero no a su forma. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional solo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (Weber y Osborn 1969).

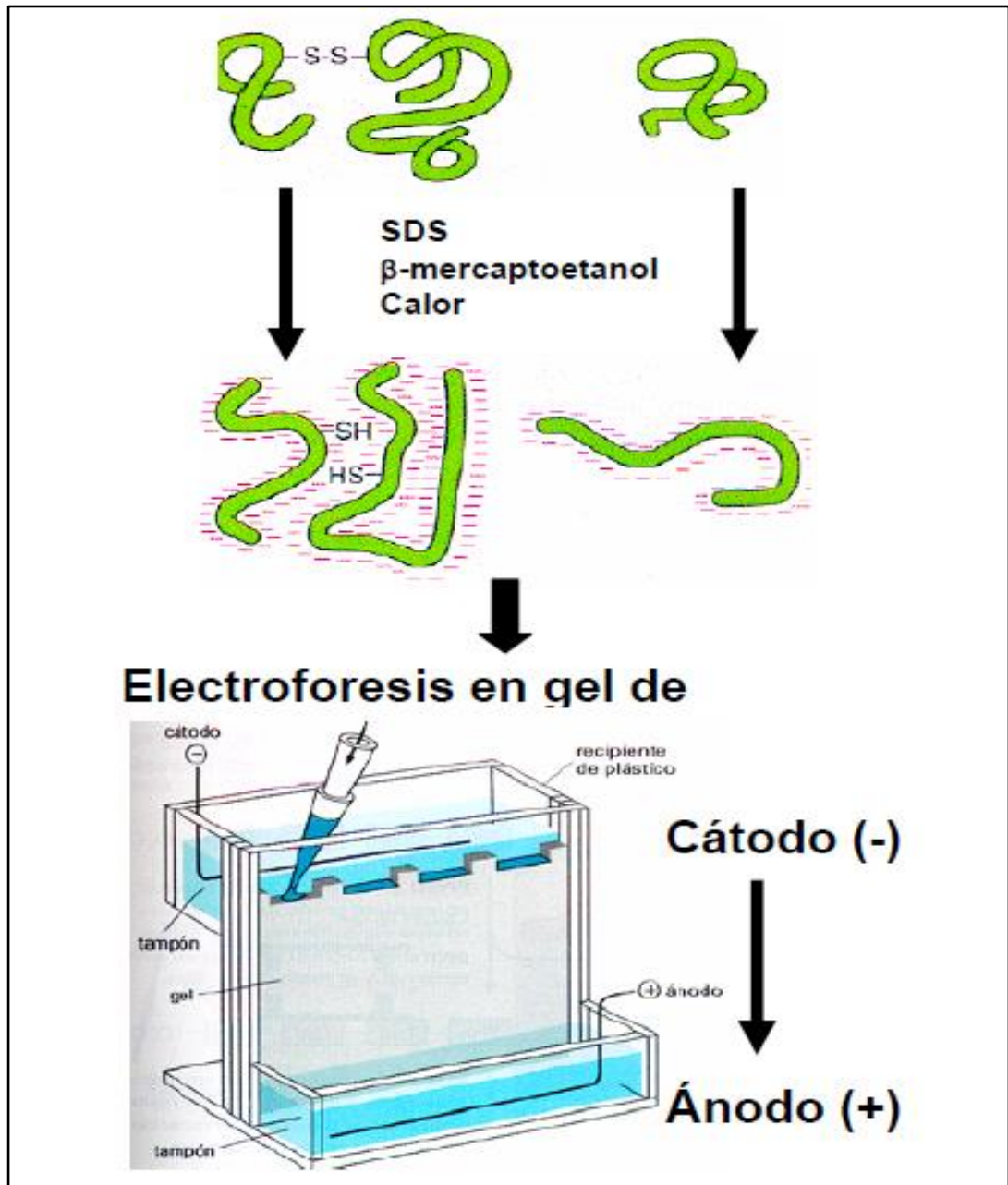


Figura 6: Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida. El tratamiento de las muestras con agentes desnaturizantes provoca la desnaturación de las proteínas, pérdida de la estructura secundaria y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis.

Fuente: Maldonado y Jorrín (2010).

Por otra parte, en la técnica SDS-PAGE, tenemos dos sistemas electroforéticos más ampliamente utilizados para separar proteínas: Glicina-SDS-PAGE (también conocida como Laemmli-SDS-PAGE) (Laemmli 1970) y tricina-SDS-PAGE (Schägger y von Jagow 1987; Schägger 2003) basadas en sistemas tampón o buffer glicina-Tris y Tricina-Tris, respectivamente. El sistema electroforético tricina-SDS-PAGE, es preferido para la resolución de proteínas menores de 30 kDa. Las concentraciones de acrilamida utilizadas en los geles son menores que en otros sistemas electroforéticos. Estas concentraciones más bajas facilitan la electrotransferencia, que es particularmente crucial para las proteínas hidrofóbicas. Tricina-SDS-PAGE también se usa preferentemente para SDS-PAGE doble (dSDS-PAGE), una herramienta proteómica utilizada para aislar proteínas extremadamente hidrofóbicas para su identificación espectrométrica de masas, y ofrece ventajas para la resolución de la segunda dimensión después de blue-native PAGE (BN-PAGE) y Clear-Native PAGE (CN-PAGE) (Schägger 2006).

Finalmente, cuando se ha completado una electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, entonces se pueden ‘revelar’ mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles (Carrillo *et al.* 2013). Schägger (2006), menciona que las bandas de proteína que contienen un mínimo de ~ 0.2 µg de proteína son adecuadas para la tinción de Coomassie. Las intensidades de tinción se pueden utilizar para estimar las proporciones molares de las subunidades proteicas de los complejos multiproteicos, excepto las subunidades muy hidrofóbicas que se tiñen muy mal. Se pueden visualizar cantidades de proteína cien veces más pequeñas utilizando uno de los numerosos protocolos de tinción con plata (Rabilloud 1992). Sin embargo, no todos los protocolos de tinción con plata parecen funcionar con los geles Tricine-SDS (Schägger 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en los laboratorios del Área de Biotecnología Industrial y Bioprocesos (BIB) del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2 MATERIA PRIMA

El hidrolizado proteico de tarwi liofilizado obtenido por hidrólisis enzimática secuencial con las proteasas Alcalasa (60 min) y Neutrasa (120 min) a 50 °C y pH 8.0 y 7, respectivamente, fue proporcionado por el BIB-IBT, resultado de la de tesis de pregrado, “Obtención de péptidos bioactivos a partir del tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante hidrólisis enzimática”.

3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1 Materiales

- Columna de vidrio para cromatografía de filtración en gel (CFG) (1.5 x 100 cm)
- Columna analítica de fase reversa (RP) para cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) Kinetex 1.7 µm HILIC C₁₈ (2.1 mm x 100 mm), pre-columna AJO8786 Phenomenex.
- Material de vidrio diverso: Embudo büchner, beakers, matraces, fiolas, pipetas, etc.
- Materiales de plástico: Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL, eppendorf de 1.5, 2.0 y 5 mL, puntas para micropipeta de 10, 200, 1000 y 5000 µL, entre otros.
- Micropipetas (20-200 µL, 100-1000 µL y 0.5-5 mL) (Brand, Alemania)
- Tips de micropipetas de 100-1000 µL, 20-200 µL, 10-100 µL y 2 -10 µL.

3.3.2 Equipos

- Agitador magnético (Cat, Modelo M6, Alemania)
- Agitador Vortex (VELP scientific, modelo F202A0175, Alemania)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2140, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS, modelo Scout, China)
- Baño maría con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand. Modelo ME2C, Alemania)
- Bomba peristáltica (Cole Pamer Instrument Co. Masterflex LIS, USA)
- Cabina de secado con flujo de aire recirculado (Fravil, Perú)
- Cámara de electroforesis, Minigel (Biometra, Göttingen, Germany)
- Cassette Pellicon XL 10 kDa (Merck Millipore, USA)
- Cassette Pellicon XL 3 kDa (Merck Millipore, USA)
- Centrífuga a temperatura ambiente (Hettich, modelo Rotina 420, Alemania)
- Centrífuga refrigerada (Hettich, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa, Perú)
- Congeladora (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo líquido UPLC compuestos de un módulo de separación Aquity HClass equipado con un autoinyector, un detector de fotodiodo Aquity (PDA eλ) y el software Empower. (Waters, Milford, USA)
- Colector de fracciones universal (Eldex Laboratories, USA)
- Congelador (Electrolux, modelo GLFC1326FW1, Canadá)
- Densitómetro de geles (GS-900TM, BioRad, USA)
- Espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific, Genesys 10 UV, USA)
- Fuente de energía, PS600 (Hoefer, Holliston MA, USA)
- Fuente de energía, PS600 (Hoefer, Holliston MA, USA)
- Lector de microplacas (BioTek Instruments Eon, Winooski, VT, USA)
- Liofilizador (Labconco, modelo Freezone Benchtop, USA)
- Placa de electroforesis 10.5 cm x 10 cm
- Potenciómetro digital (Thermo Orion, modelo 410, USA)
- Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea)

- Sistema Acquity UPLC (Waters Associates, H-Class. USA) con detector Acquity UPLC PDA (Waters Associates, USA)

3.3.3 Reactivos

- Acetonitrilo (Fermont, México)
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico 37 por ciento (J.T. Baker, México)
- Ácido etilendiamina tetracético EDTA 2 Na, grado BM (Calbiochem, USA)
- Ácido hipúrico 98 por ciento (Sigma Aldrich, India)
- Ácido picrilsulfónico 5 por ciento (Sigma Aldrich, India)
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Acrilamida para electroforesis, grado BM (Merck, Alemania)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Aldrich, India)
- Alcohol etílico PA (J.T. Baker, USA)
- Azida sódica (Sigma Aldrich, India)
- Azul Brillante Coomassie G 250 para electroforesis (Merck, Alemania)
- Bio-Gel P-2 (Bio-Rad, USA)
- Bis-Acrilamina (Acrilamida N-N metil-ene-bis) (Sigma, Aldrich, USA)
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de potasio (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)
- Dipeptidil peptidasa IV humana (DPPIV) (Sigma Aldrich, USA)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich, USA)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA) (1 U/mL) (Sigma Aldrich, USA)
- Folin-Ciocalteu 2N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Glicerol (Calbiochem, USA)
- Glicina 99 por ciento, grado BM (Calbiochem, USA)
- Gly-pro-p-nitroalínide, PM: 328.75 g/mol (Sigma Aldrich, USA)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker, México)

- Marcador de peso molecular de rango ultrabajo PM, 1060–26 600 (Sigma, Aldrich, USA)
- Mercaptoetanol, beta, grado BM (Merck, Alemania)
- Metanol (J.T. Baker, Mexico)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratado 98 por ciento (Sigma Aldrich, India)
- Persulfato de amonio (Omnipur, USA)
- SDS (sodio n-dodecyl sulfato), grado BM (Merck, Alemania)
- Solución Glutaraldehydo, grado I, 25% en H₂O (Sigma Aldrich, USA)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99 por ciento (Sigma Aldrich, USA)
- Tetrametiletano-1,2-diamina (TEMED) para electroforesis (Merck, Alemania)
- Tricina (Sigma Aldrich, USA)
- Tris Base, grado BM (Calbiochem, USA)
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich, India)

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 Determinación del contenido de proteína soluble

Se determinó según la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951), que tiene como base ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína que reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría. Brevemente el procedimiento fue el siguiente, se mezclaron 400 µL de la muestra hidrolizada con 2 mL de la solución de reacción de Na₂CO₃ al 2 por ciento en 0.1 M de NaOH, CuSO₄.H₂O al 0.5 por ciento en agua destilada y tartrato de sodio al 1 por ciento en agua destilada, en la proporción 100:1:1. A esta mezcla se le añadió 200 µL del reactivo Folin Ciocalteau 1N y el conjunto se agitó e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 650 nm. El blanco se preparó sustituyendo la muestra hidrolizada por una solución acuosa de cloruro de sodio al 0.9 por ciento. La cantidad de proteínas en la muestra se calculó a partir de una curva estándar de una solución proteica estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0.5 - 3 mg/mL (Anexo 1). Los resultados se expresaron en mg de proteína/mL.

3.4.2 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (por ciento, GH) se determinó mediante el método de Adler-Nissen (1979), basado en la determinación de los grupos amino libres con ácido 2,4,6-trinitrobenzenilsulfónico (TNBS). Las aminas primarias, al reaccionar con el TNBS forman un cromógeno que puede ser medido a 340 nm. Para la reacción, en un tubo de ensayo se agregó 0.5 mL de buffer borato 0.2 M (pH 8.2), 0.63 mL de la muestra proteica hidrolizada disuelta en SDS al 1 por ciento y 0.5 mL de una solución de ácido picrilsulfónico (TNBS, 1mg/mL). El conjunto se agitó e incubó a 50 °C durante 60 minutos en baño maría. La reacción se detuvo agregando 1mL de HCl 0.1N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se agregó 2 mL de agua destilada y se dejó reposar por 10 minutos más, antes de leer la absorbancia a 340 nm. Los resultados se determinaron empleando una curva estándar utilizando una solución de L-leucina en SDS al 1 por ciento en un rango de concentración de 0.5 – 3.0 mM (Anexo 2). Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por 0.63 mL de solución de SDS al 1 por ciento por agua. Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación:

$$GH (\%) = 100 * (AN2 - AN1) / Npb$$

Donde:

GH: Grado de hidrólisis

AN1: Nitrógeno amínico en la proteína antes de la hidrólisis, esto es la muestra tomada antes de agregar la enzima, considerada como el tiempo cero (mg/g de proteína).

AN2: Nitrógeno amínico en la proteína después de la hidrólisis (mg/g de proteína).

Npb: Nitrógeno amínico de los enlaces peptídicos en el sustrato (concentrado proteico), el cual se determinó después de la hidrólisis total con HCl 6M a 110 °C por 24 h seguido de una filtración en papel Whatman N° 40 y la posterior neutralización con NaOH 6 M.

3.4.3 Determinación de la actividad antioxidante ABTS

Se determinó utilizando el método de ABTS (Torruco-Uco *et al.* 2009), que tiene fundamento en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+}

es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) con persulfato de potasio. Se prepararon las soluciones A: 7 mM de ABTS y B: 25.4 mM de $K_2S_2O_8$, ambas diluidas en agua desionizada. Estas fueron mezcladas en una proporción de 9:1 y se almacenaron por 12 – 16 horas en oscuridad antes de su uso (Solución madre).

Posteriormente se preparó la solución diluida de $ABTS^{*+}$ en buffer fosfato salino (PBS), el cual está compuesto por 8.18 g/L de NaCl, 0.27 g/L de KH_2PO_4 , 1.42 g/L de Na_2HPO_4 , y 0.15 g/L de KCl disueltos en agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7.4 (usando NaOH 1M). Luego, la solución diluida de $ABTS^{*+}$ y el PBS fueron mezclados en una proporción 1:50, respectivamente, hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 ± 0.03 a 734 nm. Para la medición de la actividad antioxidante se tomaron 40 μ L de la muestra hidrolizada previamente diluida en PBS y se mezcló con 4 mL de la solución diluida de $ABTS^{*+}$. Después de una hora de reacción (en oscuridad) se determinó la absorbancia a 734 nm. Los resultados se determinaron mediante una curva estándar utilizando una solución de trolox en un rango de concentración de 0.5-2.0 mM trolox/L (Anexo 3), expresándose los resultados como μ mol de trolox equivalente (TE)/mL. Un blanco fue empleado, sustituyendo PBS en reemplazo de la muestra. La actividad antioxidante ABTS expresada en μ mol de trolox equivalente (TE)/mL se dividió entre el contenido de proteína soluble (mg/mL) para expresarla en μ mol de trolox equivalente (TE)/mg proteína.

3.4.4 Determinación de la actividad antihipertensiva

La actividad inhibitoria se determinó por el método de Wu *et al.* (2002), utilizando como sustrato el hipuril-histidil-leucina (HHL) determinándose la cantidad de ácido hipúrico (AH) formado. El sustrato HHL 2.17 mM se preparó en buffer borato salino (BBS) 0.2 M (pH 8.3), el cual contenía 300 mM de NaCl. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA) fue disuelta en 0.5 mL de buffer borato salino (BBS, pH 8.3).

La reacción se realizó mezclando en tubos de reacción, 50 μ L de solución de HHL 2.17 mM, 10 μ L de muestra de hidrolizado proteico a analizar y 10 μ L de solución de ECA. Se incubó bajo agitación por 30 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida con la adición de 80 μ L de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco. El control consistió en la determinación de la actividad absoluta de la ECA sobre el sustrato HHL, que resulta

en la formación de ácido hipúrico, para lo cual se reemplazaron los 10 µL de muestra proteica hidrolizada por 10 µL de BBS y la reacción se realizó en las mismas condiciones antes mencionadas. Para la preparación del blanco se usó la ECA previamente inactivada con HCl 1N y se continuó el mismo procedimiento usado para la muestra.

Todas las muestras fueron filtradas empleando filtros Millipore® de 0.22 µm. La detección y cuantificación del AH y HHL, se realizó a la longitud de onda de 229 nm, empleando un sistema UPLC compuesto de un módulo de separación Aquity H Class (Waters, Milford, USA) con un autoinyector, un detector de fotiodo Aquity (PDA eλ detector) y el software Empower. Las muestras fueron analizadas en una columna Kinetex C₁₈ RP (1.7 µm, 50 x 4.6 mm) (Waters, Milford, USA) y una guarda columna. Para eluir la columna se utilizó un gradiente compuesto por dos solventes: solvente A (0.05 por ciento de TFA en agua) y solvente B (0.05 por ciento de TFA en acetonitrilo). La corrida se realizó a 30°C, bajo un flujo de 0.5 mL/min y los resultados (ácido hipúrico) fueron monitoreados a 229 nm. El tiempo de corrida fue de 8 minutos. La actividad inhibitoria ECA fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria ECA (\%)} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] * 100$$

Donde:

Ac: Concentración de ácido hipúrico (AH) en el control

As: Concentración de AH de la muestra

Ab: Concentración AH del blanco

Los resultados se expresaron en porcentaje a una determinada concentración de proteína.

3.4.5 Determinación de la capacidad hipoglucemiante

La inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) fue medida siguiendo el protocolo descrito por Vilcacundo *et al.* (2017) y Chirinos *et al.* (2020), con ligeras modificaciones. Brevemente, una solución de la DPP-IV humana (0.26 mU por pozo; 15 µL) fue incubada a 37 °C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de muestra (para llegar a un volumen final de 50 µL por pozo). Un volumen de 50 µL del buffer (TRIS-HCl

0.1 M pH 8.0) conteniendo H-Gly-Pro-p-nitroanilina (sustrato) fue adicionado a cada pozo. Se consideró un control, donde la muestra se reemplazó por el buffer. La absorbancia fue leída a 405 nm en un lector de microplaca (Biotek Instrument, Eon; USA) a intervalos de 2 min., por un tiempo de hasta 20 min. Los valores de absorbancia fueron plotados versus el tiempo. Para los cálculos se tomó la porción de la línea recta tanto de la reacción de las muestras, como del control. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la siguiente forma:

$$\text{Inhibición de la DPP-IV (\%)} = [(V_{405 \text{ nm (control)}} - V_{405 \text{ nm(muestra)}}) / V_{405 \text{ nm(control)}}] * 100$$

Donde:

$V_{405 \text{ nm (control)}}$ = Pendiente del control obtenido a 405 nm (donde en lugar de muestra está la solución buffer).

$V_{405 \text{ nm (muestra)}}$ = Pendiente de muestra a evaluar obtenido a 405 nm.

3.4.6 Determinación de los valores IC₅₀

El IC₅₀ se define como la concentración de una muestra (en este caso del hidrolizado proteico) que permite una inhibición del 50 por ciento de las actividades de las enzimas a evaluar (en este caso para la ECA y la DPP IV). Para el cálculo se evaluaron concentraciones en un rango de 0.1 a 1.0 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinaron mediante un análisis de regresión entre el porcentaje de inhibición de la ECA y dipeptidil péptidasa IV (independientemente) frente al logaritmo de la concentración proteica (mg proteína/mL), del análisis se determinó la concentración de proteína/péptido (mg/mL) capaz de inhibir a las enzimas en un 50 por ciento. Todos los análisis fueron realizados por triplicado considerando muestras independientes.

3.4.7 Electroforesis SDS-PAGE

Se usó el protocolo reportado por Schagger y Von Jagow (1987), empleando la técnica tricina-SDS-PAGE, que permite identificar péptidos de pesos moleculares bajos, cubriendo rangos de peso molecular estrechos. La preparación de la solución madre de acrilamida-bisacrilamida (AB) fue 49.5 por ciento de bis-acrilamida (T), 6 por ciento de poliacrilamida (C), preparados disolviendo 46.5 g de acrilamida y 3.0 g de bis-acrilamida a 100 ml de agua

milliQ. El buffer para el gel fue preparado con 3 M de Tris Base. El gel de separación se preparó a partir de 2.5 mL de solución AB, 2.5 mL de buffer para gel, 1 mL de glicerol, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 10 por ciento, completando con agua milliQ para alcanzar una concentración final de acrilamida-bisacrilamida de 16.5 por ciento T y 3 por ciento de C. Esta mezcla se vertió entre las placas de electroforesis, con una separación de 1 mm, se dejó espacio suficiente para el gel de concentración y el peine. Se aguardó hasta alcanzar la polimerización (aproximadamente 30 minutos). El gel de concentración fue preparado con 0.2 mL de solución AB 0.62 mL de buffer para gel, 1.62 mL de agua milliQ, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 10 por ciento, completando con agua milliQ para alcanzar una concentración final de acrilamida-bisacrilamida de 4 por ciento de T y 3 por ciento de C. Esta mezcla se vertió sobre el gel de separación, se colocó el peine y se dejó polimerizar por 10 minutos aproximadamente. Posteriormente fue almacenado a 4°C, hasta su uso.

Las muestras de péptidos fueron tratadas independientemente con buffer de muestra, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.5 por ciento SDS, 2 por ciento de 2-mercaptoethanol, 0.01 por ciento de azul brillante G y 12 por ciento de glicerol. Para la preparación de las muestras se utilizó 2.5 μ L de las muestras del hidrolizado proteico de tarwi, permeado 10 kDa, permeado 3 kDa y la fracción de péptidos F I con 3.5 μ L de buffer de muestra; y con las muestras restantes, fracciones de péptidos F II, F III y F IV se utilizó 3.5 μ L con 2.5 μ L de buffer de muestra, para alcanzar finalmente un volumen de 6 μ L, el cual fue inyectado a los pozos del gel. Uno de los pozos fue utilizado para el marcador de peso molecular, en el cual se inyectó 5 μ L de marcador preparado, siguiendo las indicaciones del fabricante. En la cámara electroforética se utilizó el ánodo una solución buffer conteniendo 0.2 M de Tris Base, pH 8.9 ajustado con HCl concentrado y en el cátodo se agregó buffer conteniendo 0.1 M de Tris Base, 0.1M de Tricina, en SDS 0.1 por ciento, pH 8.25. La corrida electroforética se realizó a 20 °C, las condiciones fueron 30 V por 30 minutos, seguido de 110 V por 3 horas y finalmente 120 V por una hora.

Al término de la corrida electroforética el gel fue lavado por 5 minutos en agua milliQ. La fijación se realizó con una solución de glutaraldehído al cinco por ciento durante una hora, para evitar que los dos polipéptidos de menor masa molecular se difundan fuera del gel. Transcurrido los 60 minutos, se lava el gel con agua milliQ durante cinco minutos, repitiendo

dos veces. Luego el gel será teñido con azul brillante G al 0.025 por ciento en ácido acético al 10 por ciento durante una hora. Finalmente, el gel será desteñido en ácido acético al 10 por ciento con varios cambios de solución decolorante hasta visualizar claramente las bandas de péptidos.

Para la determinación del peso molecular se utilizó la captura de imagen de la corrida electroforética, utilizando un densitómetro para geles (GS-900TM, BioRad) y el procesamiento de datos se realizó con la ayuda software integrado al densitómetro, ImageLabTM Software.

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las etapas consideradas en la purificación de los péptidos del hidrolizado proteico de tarwi, se describen a continuación:

3.5.1 Separación por membranas: Ultrafiltración

Se utilizó la metodología propuesta por Ochoa (2018). Se procedió a pasar el hidrolizado proteico de tarwi por un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de tamaño de corte (*cut off*) de 10 y 3 kDa de forma secuencial. Así, luego de pasar por la membrana de 10 kDa se obtuvo dos fracciones: permeado y retentado; seguidamente, el permeado, donde se encontrarían péptidos de tamaño menor a 10 kDa fue sometido a una segunda etapa de ultrafiltración pasando por una membrana de 3 kDa para obtener otro permeado y retentado. A los permeados obtenidos de la ultrafiltración se les determinó el contenido de proteína soluble, actividad antioxidante ABTS, las actividades inhibitorias de las dos enzimas evaluadas: ECA y DPP-IV y sus respectivos valores IC₅₀. Un total de tres repeticiones fue realizado por cada proceso de ultrafiltración. Los permeados resultantes del uso de la membrana de 3 kDa, fueron agrupados y llevados a liofilización, para continuar con la siguiente etapa.

3.5.2 Separación por cromatografía a baja presión: Filtración en gel

La cromatografía de baja presión se realizó mediante la técnica de cromatografía de filtración en gel (CFG) empleando como matriz Biogel® P-2, conformado por cuentas de poliacrilamida que separan los péptidos en un rango de pesos entre 100 - 1800 Da. El gel, previamente hidratado, se llenó en una columna de vidrio (1.5 x 100 cm) y se equilibró con azida de sodio al 5 por ciento en agua. Para la separación cromatográfica, se partió de una solución a concentración proteica de 100 mg/mL, la que se inyectó en un volumen de 0.5 mL en la columna Biogel P-2 y se procedió a la elución, bajo un flujo de ~ 0.16 mL/min. Los eluidos (~1.5 mL) se colectaron en tubos de ensayo, procediendo a medirles la absorbancia a cada uno a 214 nm. Posteriormente, el total de eluidos se agruparon en cuatro fracciones: F I, F II, F III y F IV, de acuerdo a los valores de absorbancia obtenidos. Un total de tres corridas (repeticiones) fueron realizadas en esta etapa.

Las fracciones de péptidos obtenidos fueron analizadas en su actividad antioxidante ABTS, inhibición de las enzimas ECA-I y DPP-IV y sus respectivos valores de IC₅₀. El conjunto de las fracciones obtenidas de las repeticiones fueron agrupadas, y posteriormente se pasaron por liofilización para realizar el ensayo de electroforesis y estimar el rango de pesos moleculares de los péptidos presentes en las muestras (acápite 3.4.7).

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

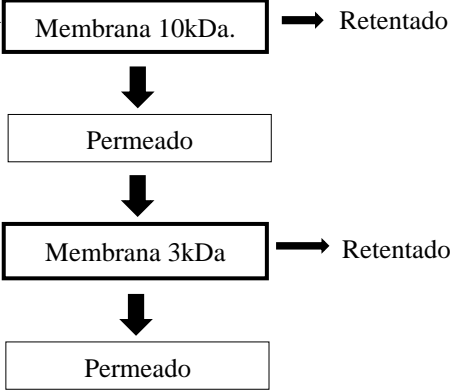
El diseño experimental, se muestra en la Tabla 4. Visto de forma general la purificación y caracterización de los péptidos provenientes del hidrolizado de la proteína de tarwi se realizó en tres etapas: separación por membranas (ultrafiltración considerando membranas de diferentes *cut off*), separación por cromatografía de filtración en gel y la caracterización mediante electroforesis.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) con un diseño completo al azar (DCA), para poder analizar el efecto de cada etapa seguida en la purificación del hidrolizado de proteína de tarwi (ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel) sobre la actividad inhibitoria de

las enzimas ECA y DPP-IV y sus IC_{50} y la actividad antioxidante ABTS, (variables respuesta). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. De existir diferencias significativas, se procedió a realizar una comparación de medias de Duncan de las variables respuestas con un nivel de aceptación del 95 por ciento. El análisis de datos se realizó empleando el software SPSS (versión 19.0) con la prueba de rango múltiple de Duncan.

Tabla 4: Diseño experimental para la purificación de péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante del tarwi.

Etapas	Materia prima	Ultrafiltración	Cromatografía de baja presión	Electroforesis SDS-PAGE
Variables y/o tratamientos	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">Hidrolizado proteico de tarwi</div>	 <p>El permeado con mayor AA e inhibición enzimática de ECA y DPP-IV será evaluado por cromatografía de baja presión.</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">Cromatografía de filtración en gel</div> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">Fracciones de péptidos a ser evaluados en las propiedades bioactividad.</div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">→</div>	Determinación de pesos Moleculares.
Análisis	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación de proteína soluble - Determinación de grado de hidrolisis - Act. Antioxidante ABTS - Determinación de inhibición de la ECA - Determinación de inhibición DPP-IV - Valor IC₅₀ 	<p><u>En los permeados:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Det. de proteína soluble - Act. Antioxidante ABTS - Det. de inhibición de la ECA - Det. de inhibición de DPP-IV - Valor IC₅₀ 	<ul style="list-style-type: none"> - Det. de proteína soluble - Act. Antioxidante ABTS - Det. de inhibición de la ECA - Det. de inhibición de DPP-IV - Valor IC₅₀ 	

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI

En la Tabla 5, se presentan las características del hidrolizado proteico de tarwi (HPT) obtenido de la hidrólisis enzimática conducida con Alcalasa-Neutrasa por 180 min.

Tabla 5: Grado de hidrólisis, actividad antioxidante, inhibición de la ECA y DPP-IV y sus respectivos valores de IC₅₀ del hidrolizado proteico de tarwi

Características	Valor*
Grado de hidrólisis (%)	38.92 ± 0.526
Actividad antioxidante (μmol TE/mg proteína)	1.85 ± 0.016
Inhibición de ECA (%) (evaluado a la concentración de 0.75mg/mL)	86.81 ± 0.70
Valor IC ₅₀ para la ECA (mg/mL)	0.103 ± 0.012
Inhibición de la DPP-IV (%) (evaluado a la concentración de 3mg/mL)	50.66 ± 0.66
Valor IC ₅₀ para la DPP-IV (mg/mL)	3.12 ± 0.081

*Los valores son expresados como promedio de tres repeticiones ± desviación estándar (DS).

La elección de las enzimas Alcalasa-Neutrasa para la obtención del hidrolizado proteico de tarwi en dos etapas, fue en base a una investigación precedente donde se optimizó la obtención de un hidrolizado proteico multifuncional a partir de tarwi (Chirinos *et al.* 2020). Hay que destacar que la selección de las enzimas empleadas en el proceso de hidrólisis depende de su eficacia, especificidad y otras propiedades (ej. peso molecular, polaridad y carga), así cada enzima es responsable de la generación de diferentes fragmentos que varían en peso molecular y en secuencia de aminoácidos, que influirán en sus características de bioactividad (Saadi *et al.* 2015).

Diversos estudios han empleado la combinación secuencial de enzimas como una estrategia para la producción de péptidos bioactivos, así, por ejemplo, usando proteasas de tipo endoproteasas se pueden conseguir péptidos de mayor tamaño que usando exopeptidasas. Las aminoexopeptidasas generalmente se asocian con la liberación de productos con uno, dos o tres residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, mientras que las carboxiexopeptidasas son capaces de liberar aminoácidos o dipéptidos del extremo C-terminal; sin embargo, las endopeptidasas no están restringidas a los extremos terminales, por lo tanto, pueden ser más selectivas (McDonald 1985).

La enzima Neutrasa es una metaloproteasa que tiene como sitio de acción catalítico a los aminoácidos leucina (Leu) y valina (Val) y al cofactor metal hierro, actúa desde el interior de la proteína (acción endopeptidasa) y a su vez sobre los extremos de la proteína (acción exopeptidasa) (Benitez *et al.* 2008); mientras que la Alcalasa se considera como una “endopeptidasa de serina” ya que inicia la escisión sobre el enlace peptídico a través de un residuo de serina (Ser) que pertenece a la típica triada catalítica (Asp-His-Ser) (Oc 2015). La eficiencia de la Alcalasa se ha asociado con su amplia especificidad y su preferencia en la descomposición de aminoácidos hidrófobos que actúan como donantes de hidrógeno (Samaranayaka y Li 2011). Segura (2010) menciona al respecto, que el fraccionamiento de los enlaces peptídicos por una endopeptidasa incrementa el número de sitios terminales de los péptidos expuestos a la acción exopeptidasa. Adicionalmente, algunos autores señalan también que las proteasas alcalinas (ej. Tripsina y Alcalasa) exhiben mayor actividad proteolítica que las proteasas neutras (Neutrasa, Protamex, Flavourzyme y otras); por esta razón una combinación de Alcalasa y Neutrasa resulta una buena estrategia de unión-equilibrio, ya que podría facilitar la acción catalítica, liberando aminoácidos en N-terminal, por la fragmentación de aminoácidos no terminales (endopeptidasa) y posteriormente reducir aún más el tamaño del fragmento con la escisión del enlace peptídico de los aminoácidos terminales (exopeptidasa). Por consiguiente, la susceptibilidad, actividad biológica del hidrolizado está relacionado principalmente al tipo de enzima utilizada, además de las características del sustrato, concentración del sustrato, temperatura, pH, relación enzima-sustrato y tiempo de reacción, lo que se demuestra en los valores obtenidos para el HPT, de acuerdo a la Tabla 5.

El grado de hidrólisis (GH) promedio obtenido para el HPT fue de 38.9 por ciento, en comparación con otros granos andinos presentó un valor superior al reportado por Ochoa

(2018) para un hidrolizado de cañihua con Neutrasa-Alcalasa (29.10 por ciento) y Cisneros (2017) en un hidrolizado de quinua con Neutrasa (26 por ciento), pero inferior al determinado por Velásquez (2018) en un hidrolizado de kiwicha con Alcalasa (57 por ciento). Luego de realizar el proceso de hidrólisis, podemos tener la certeza que se ha conseguido fragmentar los péptidos en tamaños largos, medianos y pequeños. Según, Daliri *et al.* (2017) los tamaños respecto al peso molecular de péptidos antioxidantes son < 10 kDa y los antihipertensivos oscilan de 21 a 24 kDa, por lo tanto, las proteasas que rinden péptidos de bajo peso molecular serian adecuados para la producción comercial de péptidos antioxidantes, antihipertensivos y otros.

Referido a la propiedad antioxidante, destaca que el valor de la actividad antioxidante (AA) fue de $1.85 \mu\text{mol TE/mg}$, valor relativamente menor al reportado por Ochoa (2018) en el hidrolizado de cañihua ($1.95 \mu\text{mol TE/mg}$), pero mayor al reportado por Cisneros (2017) en el hidrolizado de quinua ($1.67 \mu\text{mol TE/mg}$). Al respecto, es conocido que existen dos mecanismos principales por los cuales las moléculas antioxidantes pueden desactivar los radicales libres: la transferencia de electrones individuales y la transferencia de átomos de hidrógeno (Prior *et al.* 2005). El ensayo ABTS, se basa en la reducción del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en presencia de sustancias antioxidantes que siguen el mecanismo de transferencia de un solo electrón (Chen *et al.* 2015). Chi *et al.* (2015) señalan que los hidrolizados de proteína con bajo peso molecular interactúan de forma más eficaz con los radicales que intervienen en el proceso de oxidación. Se ha postulado también que la actividad antioxidante total debe atribuirse a efectos de integración en lugar de péptidos individuales.

El HPT presentó actividad inhibitoria de la ECA de 86.8 por ciento a la dosis de 0.75 mg/mL y de 84.4 por ciento a la dosis de 0.5 mg/mL , este último valor superior al hidrolizado de cañihua (69.85 por ciento) reportado por Ochoa (2018), para el hidrolizado de quinua (59.1 por ciento, Cisneros 2017) y al hidrolizado de kiwicha (72.84 por ciento, Velásquez 2018) todos ellos evaluados a una concentración de 0.5 mg/mL . Adicionalmente indicar, que el valor obtenido para el Captopril (primer fármaco inhibidor de la enzima ECA creado para el tratamiento de la hipertensión) usado como control positivo por Gangopadyay (2016) presentó un valor inhibitorio para la ECA de 87.46 por ciento a una concentración de 0.05 mg/mL .

El IC_{50} que representa la concentración de un compuesto donde se observa el 50 por ciento de su efecto, indica que a menores concentraciones resultan más efectivos (Ochoa 2018). El HPT presentó un valor IC_{50} para la ECA de 0.103 mg/mL, un valor inferior al reportado por Ochoa (2018) en hidrolizado de cañihua con Neutrasa y Alcalasa (0.16 mg/mL), por Cisneros (2017) en hidrolizado de quinua con Neutrasa (0.3 mg/mL) y Velásquez (2018) en hidrolizado de kiwicha con Alcalasa (0.3 mg/mL).

Respecto a la inhibición de la DPP-IV, el porcentaje obtenido para el HPT fue de 50.6 por ciento a una concentración de 3 mg/mL con un IC_{50} de 3.12 mg/mL. Velarde-Salcedo *et al.* (2013) al utilizar la enzima Tripsina bajo condición de digestión gastrointestinal *in vitro* en semillas de amaranto y trigo obtuvieron más del 50 por ciento de inhibición de DPP-IV y valores de IC_{50} de 1.1 y 0.8 mg/mL respectivamente, y en soya se reportó IC_{50} de 1.4 mg/mL, siendo todos los valores citados menores a los encontrados en el HPT. La actividad inhibidora de DPP-IV se ha asociado también, al igual que con la inhibición de la ECA, con péptidos de menor peso molecular y a su vez con las características particulares de los aminoácidos que componen los péptidos (Velarde-Salcedo *et al.* 2013).

4.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS

Para identificar la estructura del péptido bioactivo, el proceso de purificación juega un papel vital (Levison 2003). La eficiencia del proceso de purificación se basa en el método empleado, así se han desarrollado métodos de filtración por membranas juntamente con diversas técnicas cromatográficas como: la cromatografía de filtración en gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de alta resolución de fase reversa RP-HPLC (Mannur y Norizah 2020), entre otros.

4.2.1 Purificación del hidrolizado de tarwi por ultrafiltración

El proceso de purificación del hidrolizado proteico de tarwi se inició con la ultrafiltración secuencial, usando membranas de tamaño de corte de 10 y 3 kDa como paso previo a la cromatografía de filtración en gel. Picot *et al.* (2010), señalan que este proceso permite refinar el hidrolizado para obtener una actividad específica mejorada y así agregar valor económico a productos bioactivos destinados a consumo humano y animal. Esta técnica puede proporcionar un gran número de separaciones (Langevin *et al.* 2012) ya que se puede

obtener diversas fracciones (permeados) tomando en consideración la selección de membranas de filtro de rango de separación entre 1 a 10 kDa (Picot *et al.* 2010). Además, mencionan que la pureza de los hidrolizados ultrafiltrados podría ascender de 1 a 525 veces en comparación con los hidrolizados crudos (Mahmoodani *et al.* 2014); sin embargo, presenta limitaciones referentes a la presencia de sales (muy bajo peso molecular) debido a la escasa selectividad de la membrana, otro demérito es la posible contaminación, que podría reducir la vida útil de la membrana e incrementar el costo del proceso (Xueqin *et al.* 2017). Los resultados obtenidos del proceso de ultrafiltración al que fue sujeto el hidrolizado proteico de tarwi se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg}$ proteína), inhibición de la actividad ECA - I (%) y DPP-IV (%) y valores de IC_{50} para el hidrolizado proteico de tarwi y los permeados obtenidos luego del proceso de ultrafiltración*

Componente	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg}$)	Inhibición de la ECA (%) (a 0.75 mg/mL)	Valor IC_{50} -de la ECA (mg/mL)	Inhibición de DPP-IV (%) (a 3mg/mL)	Valor IC_{50} -DPP-IV (mg/mL)
Hidrolizado proteico de tarwi	1.85 ± 0.016^a	86.81 ± 0.70^a	0.10 ± 0.01^a	50.66 ± 0.66^a	3.12 ± 0.081^c
Permeado de 10 kDa	1.67 ± 0.02^b	80.35 ± 0.07^b	0.13 ± 0.01^a	24.56 ± 3.23^b	5.92 ± 0.27^a
Permeado de 3 kDa	1.89 ± 0.04^a	81.58 ± 0.13^b	0.11 ± 0.00^a	37.41 ± 0.09^b	3.71 ± 0.48^b

* Promedio de tres repeticiones \pm DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

El proceso de ultrafiltración se llevó a cabo en dos etapas secuenciales, la primera realizada con la membrana de 10 kDa, donde se obtuvo un permeado con una AA de $1.67 \mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, mientras que con la membrana de 3 kDa, el permeado alcanzó un valor de $1.89 \mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, presentándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos productos (Anexo 4). El mayor valor de AA encontrado en el permeado de $< 3\text{kDa}$, podría ser debido a que esta fracción probablemente presenta una distribución de péptidos de menor peso molecular que exhiben mayores actividades antioxidantes. No se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$), entre el HPT y el permeado de la membrana 3kDa, con valores de 1.85 y $1.89 \mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, respectivamente, posiblemente en el HPT se

encontraron productos que contribuirían a la propiedad antioxidantes evaluada por el método del ABTS (ej. compuestos fenólicos, agentes reductores, entre otros) que, al ser separados por ultrafiltración, ya no estarían presentes en el permeado de 3 kDa, atribuyéndose el valor a la mayor presencia de péptidos en dicha fracción. Las actividades antioxidantes encontradas en los permeados de la presente investigación fueron ligeramente inferiores respecto a los reportados por Ochoa (2018) en permeados de 10 y 3 kDa en hidrolizados proteicos de cañihua con valores de 2.01 $\mu\text{mol TE/mg}$ y 2.11 $\mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, respectivamente; sin embargo, fueron mayores a los valores reportado por Cisneros (2017) en el proceso de ultrafiltración del hidrolizado de quinua donde los permeados obtenidos de $< 10\text{kDa}$, entre 3-10kDa y $< 3\text{kDa}$, presentaron AA de 1.55, 1.72 y 1.77 $\mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, respectivamente.

Kim y Wijesekara (2010), señalan que la mayoría de los péptidos bioactivos de fuentes naturales tienen pesos molecular menores a 6 kDa, debido a que el proceso de ultrafiltración podría ayudar a concentrar al conjunto de estos péptidos con potencial de actividad antioxidante. Guo *et al.* (2015) determinaron en hidrolizados de semilla de ciruela fraccionadas por membranas de 10, 5 y 3 kDa, que la fracción < 3 kDa exhibió la mayor capacidad antioxidante evaluada con los ensayos de DPPH, radical hidroxil y anión superóxido, a diferencia de las otras fracciones y del hidrolizado inicial. Por otro lado, Zou *et al.* (2020) trabajaron con un hidrolizado de salvado de trigo con Alcalasa que luego separaron en diferentes fracciones peptídicas en función a su peso molecular <1 , entre 1–3 y 3–5 y 5–10 kDa, mediante ultrafiltración, encontrando mayor AA frente a radicales de oxígeno y mejores resultados para la inhibición de la ECA (84.25 por ciento) en la fracción < 1 kDa, adicionalmente determinaron que esta fracción presentó contenidos más altos de aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos aromáticos (35.2 y 7.4 por ciento, respectivamente), en especial, contenidos particularmente altos de Val (valina), Phe (fenilalanina), Leu (leucina), Ala (alanina) y Thr (treonina), en comparación con las otras fracciones > 1 kDa.

La presencia de un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en los hidrolizados de proteínas ofrece propiedades estructurales que pueden mejorar las interrelaciones con los alimentos lipídicos y contribuir a una mayor entrada de los péptidos en el órgano diana a través de interacciones hidrofóbicas con bicapas lipídicas de membrana y así mejorar los efectos antioxidantes *in vivo* (Sarmadi y Ismail 2010). Los aminoácidos aromáticos tienen la

capacidad de eliminar los radicales libres y, por lo tanto, inhibir la propagación de subproductos de lípidos oxidados (Girgih *et al.* 2015). Borja (2014) señala también que las propiedades antioxidantes de los péptidos están más relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad, donde Tyr (tirosina), Trp (triptófano), Met (metionina), Lys (Lisina), Cys (cisteína), son ejemplos de aminoácidos que contribuyen a la actividad antioxidante y por tanto su presencia en la estructura de los péptidos aportan esta característica. Por otra parte, Rajapakse *et al.* (2005) señalan que los aminoácidos con residuos aromáticos mejoran las propiedades de eliminación de radicales por parte de los péptidos, porque pueden donar protones a los radicales deficientes en electrones y conferir estabilidad.

En otro estudio, Famuwagun *et al.* (2020) fraccionaron por ultrafiltración un hidrolizado de proteína de hoja de calabaza, para obtener fracciones de péptidos de <1, entre 1-3, 3-5 y 5-10 y >10 kDa, donde las fracciones < 1 y entre 1-3 kDa, fueron los mejores eliminadores de radicales libres y quelantes metálicos más efectivos, además de sus fuertes actividades inhibitorias contra la α -amilasa, la α -glucosidasa y la ECA. Así mismo Nwachukwu *et al.* (2014) señalan que la ultrafiltración mejoró significativamente la inhibición de ECA por los péptidos de las fracciones de membrana < 1 y entre 1-3 kDa, en un hidrolizado de proteína de linaza digeridas por la proteasa Termoasa GL-30. En el presente trabajo la fracción permeada obtenida de la membrana de 3 kDa, exhibió actividad de inhibición de la ECA de 81.5 por ciento, valor que mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) con el permeado de 10 kDa, pero no con el HPT (86.81 por ciento), nuevamente la eliminación de componentes de naturaleza no proteica en el permeado de 3 kDa, que aportarían a la inhibición de la ECA (ej. compuestos fenólicos), harían que el valor encontrado fuera producto de la acción de los péptidos concentrados en esta fracción. Respecto a los valores IC_{50} determinados, se observó que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre todas las fracciones evaluadas (Tabla 6, Anexos 5 y 6).

Singh (2016), menciona que la presencia de una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos es una característica típica de los péptidos inhibidores de la ECA y de los péptidos antioxidantes. De otro lado, Hayes *et al.* (2016) indican que generalmente los tres aminoácidos presentes en el extremo del C-terminal de la secuencia peptídica son particularmente importantes para la inhibición de la ECA e interactúan con el sitio activo de esta enzima, además mencionan que la ECA presenta afinidad con los aminoácidos

hidrofóbicos, incluyendo residuos aromáticos tales como Phe, Trp y Tyr y aminoácidos de cadena ramificada que incluyen Val, Leu e Ile en la secuencia al final del péptido.

Por otra parte, respecto a la inhibición de DPP-IV (Tabla 6) se observó que el valor de la fracción permeada < 3 kDa fue 37.41 por ciento, valor significativamente menor ($p < 0.05$) al HPT (50.66 por ciento), pero mayor al del permeado de 10 kDa (24.56 por ciento) (Anexo 7), lo que significaría que el permeado < 3 kDa presenta mayor efecto hipoglicemiante que el permeado < 10 kDa. Al calcular el IC_{50} para la DPP-IV, se encontró que el permeado de 3 kDa presentó el menor valor (3.71 mg/mL, importante porque indica que con una concentración menor se logra inhibir el 50% de la enzima bajo estudio) respecto al obtenido del permeado de 10 kDa que fue el más alto (5.92 mg/mL), existiendo claras diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambas fracciones. Al igual que para el caso de las propiedades antioxidante y antihipertensiva, los valores estarían influenciados por la composición de los péptidos y su afinidad frente a la inhibición de DPP-IV. Tulipano *et al.* (2015) indican que los péptidos con mayor potencial de inhibir la DPP-IV generalmente contienen un aminoácido de cadena ramificada como Leu, Ile o Val, o un residuo aromático con un grupo polar en la cadena lateral (principalmente Trp) en su posición N-terminal. Es así que, Oseguera-Toledo *et al.* (2015) al evaluar el efecto de la proteína de *Faseolus vulgaris* (frijol Pinto Durango y Negro) hidrolizada con Alcalasa y Bromelina, separadas en cinco fracciones peptídicas (<1, entre 1–3.5, 3.5–5 y 5–10 y > 10 kDa) por ultrafiltración, encontraron que la fracción < 1 kDa con Alcalasa inhibió a DPP-IV en un 55.3 por ciento, identificando dentro de esta fracción a los péptidos LLSL (leucina-leucina-serina-leucina), QQEG (glutamina-glutamina-ácido glutámico-glicina) y NEGEAH (asparagina-ácido glutámico-glicina-ácido glutámico-alanina-histidina) como los más potentes. Así mismo Lichan *et al.* (2012) determinaron la actividad inhibidora de la DPP-IV en hidrolizados proteicos de la gelatina de piel de salmón conducidos con Alcalasa, Bromelina y Flavourzyme, donde el hidrolizado de Flavourzyme mostró la mayor actividad inhibidora de DPP-IV, el mismo que luego de pasar por el proceso de ultrafiltración con membranas de *cut off* de 2.5 y 1 kDa, encontraron que los péptidos en la fracción de < 1 kDa tenían la mayor tasa de inhibición de DPP-IV (61.2 por ciento) con un IC_{50} de 1.35 mg/mL, mientras que aquellos dentro de las fracciones > 2.5 y entre 1–2.5 kDa mostraron menores valores de inhibición (29.6 y 43.2 por ciento), respectivamente.

4.2.2 Cromatografía de filtración en gel

El proceso de cromatografía de filtración en gel (CFG) se usa para soluciones de péptidos parcialmente purificados, una de las ventajas significativas asociadas con esta técnica es que la composición del tampón no tiene impacto en la resolución, ya que las moléculas no se adhieren a la matriz, además tiene una alta resolución y alta selectividad, lo que es un paso clave en un proceso de purificación; sin embargo, también presenta algunos inconvenientes como el tiempo prolongado para la recolección de muestras y costos elevados (Xueqin *et al.* 2017).

Para este proceso se utilizó la fracción permeada de la membrana de 3kDa la cual fue inyectada en una columna con la matriz Biogel P-2, procediendo con la elución y la detección con una absorbancia de 214 nm, de donde se obtuvo el cromatograma de la Figura 7. Los eluidos se agruparon en cuatro fracciones: F I, F II, F III y F IV en función a la absorbancia obtenida y se les determinó la actividad antioxidante y valores de IC₅₀ para la inhibición de la ECA y DPP-IV, los resultados se presentan en la Tabla 7. De acuerdo al fundamento de separación de la CFG, en las primeras fracciones se eluyen los compuestos de mayor peso molecular y al final los de menor peso molecular.

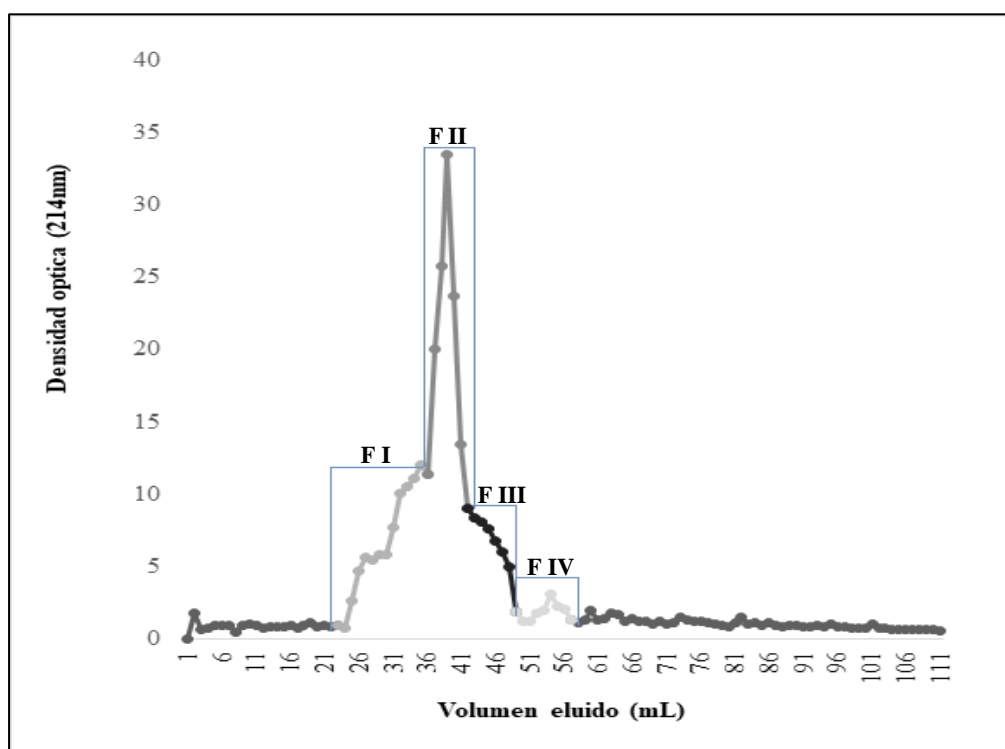


Figura 7: Cromatograma de la separación mediante cromatografía de filtración en gel del permeado de 3kDa obtenido a partir del hidrolizada proteico de tarwi.

Tabla 7: Características, de las fracciones obtenidas durante el proceso de cromatografía de filtración en gel (Biogel P-2)*

Fracción	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg}$ de proteína)	Valor IC₅₀ para la ECA (mg/mL)	Valor IC₅₀ para la DPP-IV (mg/mL)
F I	0.93 ± 0.08^d	0.14 ± 0.05^a	ND
F II	1.68 ± 0.28^c	0.15 ± 0.01^a	6.71 ± 2.69^a
F III	3.82 ± 0.02^b	0.05 ± 0.01^b	1.07 ± 0.13^b
F IV	6.41 ± 0.25^a	0.06 ± 0.04^b	0.32 ± 0.01^b

* Los valores medios que presentan diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$). N.D: no detectado a dosis ≤ 9 mg/mL.

La AA que exhibieron las cuatro fracciones: F I, F II, F III y F IV, fueron de 0.93, 1.68, 3.82 y 6.41 $\mu\text{mol TE/mg}$, respectivamente, destacando en valor la F IV seguido de la F III. El análisis estadístico encontró que todas las fracciones presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7, Anexo 9). Los valores encontrados respecto a la AA de las fracciones F III y F IV fueron mayores a los reportados por Ochoa (2018) después de que el permeado de 3 kDa de un hidrolizado proteico de cañihua fuera eluido también por cromatografía de filtración en gel de donde se obtuvo tres fracciones I, II y III con actividades antioxidantes de 1.09, 2.22 y 3.18 $\mu\text{mol TE/mg}$, respectivamente. Cabe destacar que la F IV presentó la mayor actividad antioxidante, con un valor de más del triple respecto a la presentada por el HPT (1.85 $\mu\text{mol TE/mg}$), lo que demuestra una fuerte influencia a la propiedad antioxidante por parte del tamaño molecular de los péptidos presentes en las fracciones obtenidas.

Yu *et al.* (2016) señalan, que péptidos con peso molecular de 200 a 3000 Da, tienen mayor actividad antioxidante; dependiendo de la conformación a nivel de aminoácidos. La participación de los aminoácidos hidrofóbicos, como Trp, Phe, Val, Ile, Leu, Ala, Pro y Gly en la conformación de los péptidos, incrementan la solubilidad de los péptidos en lípidos facilitando la interacción con especies radicales (Samaranayaka y Li-Chan 2011) en sistemas lipídicos; así también los del tipo hidrofóbicos aromáticos, como Phe, Tyr y Trp se han considerado eliminadores efectivos de especies radicales, convirtiéndolos en moléculas estables por donación de protones y manteniendo la estabilidad a través de estructuras de resonancia (Sarmadi y Ismail 2010). Además, se creó que la presencia de aminoácidos de

cadena ramificada, incluidos la Ile, Leu y Val en la secuencia peptídica, poseen altas actividades antioxidantes (Jin *et al.* 2015) y por último la presencia de Leu e Ile en el extremo N-terminal de los péptidos se ha acreditado como las mejores actividades de captación de radicales (Zhang *et al.* 2019).

Varios autores mencionan que los péptidos antioxidantes son eliminadores efectivos de radicales libres, inhibidores de la peroxidación de lípidos, agentes quelantes de metales de transición e inactivadores de especies reactivas de oxígeno intracelulares (Sarmadi y Ismail 2010). Además, los péptidos antioxidantes derivados de fuentes vegetales o animales se consideran más seguros que los antioxidantes sintéticos como el tert-butilhidroxiquinona (TBHQ) e hidroxianisol butilado (BHA) (Chen *et al.* 2021).

Respecto a la actividad de inhibición de la ECA, los valores de IC₅₀ no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre F I (0.14 mg/mL) y F II (0.15 mg/mL), al igual que, entre F III (0.05 mg/mL) y F IV (0.06 mg/mL), siendo estas dos últimas fracciones quienes exhibieron la mayor actividad de inhibición de la ECA (Anexo 10). Valores similares fueron reportados por Ochoa (2018) en las fracciones F II (0.14 mg/mL) y F III (0.05 mg/mL) obtenidas después del proceso de cromatografía de filtración en gel por las que pasó el permeado de 3 kDa de un hidrolizado proteico de cañihua. Al respecto, se debe volver a recalcar la importancia del tipo de aminoácido presente, así como su lugar en la secuencia dentro del péptido, que influyen en las propiedades bioactivas del mismo, así por ejemplo Lin *et al.* (2018) buscaron comparar la actividad IC₅₀ de la ECA para el dipéptido Trp-Val y su secuencia inversa; demostrando que los dipéptidos que contienen Trp en el extremo N-terminal del péptido exhibieron una actividad inhibidora de la ECA más baja que los dipéptidos que contienen Trp del residuo C-terminal (Val-Trp), donde el IC₅₀ aumentó de 0.58 μ M para Val-Trp a 307.6 μ M para Trp-Val. Estos resultados concuerdan con la importancia de los aminoácidos en el extremo C-terminal de los dipéptidos, según lo informado por Ono *et al.* (2005). Péptidos como Val-Trp, Ile-Trp y Leu-Trp exhibieron una excelente inhibición de la ECA, lo que posiblemente se debe a que los terminales carboxilo de estas secuencias peptídicas eran todos aminoácidos hidrofóbicos aromáticos que contenían Trp, mientras que los terminales nitrogenados eran todos aminoácidos hidrófobos de cadena ramificada (Lin *et al.* 2018). Al respecto algunos estudios realizados por He *et al.* (2012) y Wu *et al.* (2006) usando Z descriptores para investigar la relación estructura-actividad cuantitativa de 58 dipéptidos frente a la ECA, descubrieron que la inhibición de la

ECA se vio muy afectada por las propiedades químicas tridimensionales y la hidrofobicidad de los aminoácidos C-terminales. En este sentido los dipéptidos con aminoácidos hidrófobos aromáticos en el C-terminal, como el Trp, Phe y Tyr, tienen una actividad inhibidora de la ECA más potente (Lin *et al.* 2018). Otros estudios también indican que una mejor actividad inhibidora de la ECA corresponde a los péptidos que contienen residuos de aminoácidos como Phe, Pro, Trp, Tyr, Lys, Leu, Ile y Val en el extremo C-terminal de los péptidos (Guang y Phillips 2009; Ngo *et al.* 2014).

Según Mulero *et al.* (2011) y Korhonen y Pihlanto (2007), la principal razón del efecto de los péptidos antihipertensivos es la inhibición de la actividad de la ECA mediante la competencia con el sustrato por el centro activo de la enzima o la unión a una zona diferente al centro activo para producir una deformación de manera que impide el enlace con el sustrato. Por otra parte, existen muchos inhibidores sintéticos de la ECA (captopril, fosinopril, enalapril, ramipril y lisinopril); sin embargo, estos inhibidores tienen efectos secundarios (Agostoni y Cicardi 2001; Chen *et al.* 2013). El captopril es posiblemente el fármaco sintético más utilizado para la inhibición de ECA, con un IC_{50} de 0.004 mg/mL (Kang 2013), este valor muestra gran ventaja respecto a la fracción F IV obtenida en el presente estudio (IC_{50} de 0.06 mg/mL). Lo que corrobora lo mencionado por Gangopadhyay *et al.* (2016), quienes señalan que los péptidos derivados de los alimentos son generalmente 10-1000 veces menos activos que los fármacos comercialmente disponibles, tales como el captopril. Sin embargo, existen estudios que mencionan fuentes naturales que pueden exhibir propiedades de inhibición de la ECA cercanas al captopril, como el trabajo desarrollado por Lu *et al.* (2010), quienes encontraron un tripéptido (Ile-Gln-Pro) inhibidor de la ECA a partir de un hidrolizado de *Spirulina platensis* con Alcalasa, dicho tripéptido exhibió un valor IC_{50} de 5.77 μ M y logró el mismo efecto hipotensor que el captopril cuando fueron administradas a ratas espontáneamente hipertensas a la misma dosis después de dos a cuatro horas mediante alimentación por sonda.

De otro lado, el valor obtenido de IC_{50} para la DPP-IV en las fracciones F II, F III y F IV, fue 6.71, 1.07 y 0.32 mg/mL, respectivamente, la F I no evidenció inhibición incluso a la máxima concentración analizada (9.0 mg/mL). La F II (6.71 mg/mL), presentó un valor considerablemente alto, con diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a F III y F IV, siendo estas dos últimas las que mostraron los valores más bajos, 1.07 y 0.32 mg/mL, respectivamente (Anexo 11). Estos valores pueden ser comparados con lo reportado por

Velarde-Salcedo *et al.* (2013) que trabajaron con hidrolizados de glutelinas de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* obtenidas mediante digestión con Tripsina de páncreas porcino, donde la actividad inhibitoria contra la DPP-IV varió en valor entre IC_{50} de 1.2 a 2.0 mg/mL, en función al tipo y dosis de enzima empleada, estos valores fueron más alentadores cuando los fragmentos mayores a 10 kDa fueron eliminados por ultrafiltración mejorándose el IC_{50} para la fracción < 10 kDa, obteniéndose valores entre 1.0-1.6 mg/mL, siendo éstos valores cercanos a lo reportado en el presente estudio para la F III, pero resultan mayores a la F IV. Al respecto una patente de Pieter (2006) ha informado sobre las estructuras de 21 péptidos capaces de inhibir la DPP-IV, los que presentan carácter hidrofóbico, una longitud que varía de dos a ocho aminoácidos y contienen un residuo Pro dentro de sus secuencias, ubicado en el primer, segundo, tercer o cuarta posición del extremo N- terminal; además, el residuo Pro puede estar acompañado por Leu, Val, Phe, Ala y Gly. Esta información es consistente para los hallazgos de los péptidos con actividad inhibitoria de DPP-IV, a partir de hidrolizados de soya y tarwi, donde se obtuvieron seis péptidos con dicha actividad, pero solo dos de ellos IAVPTGVA (de soya, Ile-Ala-Val-Pro-Thr-Gly-Val-Ala) y LTFPGSAED (del lupino, Leu-Thr-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Glu-Asp) resultaron ser inhibidores eficientes de DPP-IV con IC_{50} de 106 y 228 μ M, respectivamente (Lammi *et al.* 2016). Li-Chan *et al.* (2012) encontraron que después de la purificación de péptidos inhibidores de DPP-IV derivado de proteína hidrolizada de piel de salmón mediante HPLC, se obtuvo cinco fracciones (F-1 a F-5) de las cuales la F-1 tuvo la mayor tasa de inhibición de DPP-IV con un IC_{50} de 57.3 μ g/mL (0.0573 mg/mL).

Los valores presentados son muy alentadores respecto a la inhibición de DPP-IV debido a que el objetivo de este tipo de investigaciones es poder encontrar péptidos bioactivos sustitutos de los fármacos contra DPP-IV, o en su defecto que sean empleados en la prevención de la enfermedad DM 2. Así, podemos mencionar a la diprotina A, conocida farmacológicamente como el péptido con mayor actividad inhibidora de la DPP-IV, razón por la que es utilizada como control positivo en algunos estudios para poder comparar la actividad de inhibición de DPP-IV con los péptidos bioactivos de origen animal o vegetal. Referente a ello, Li-Chan *et al.* (2012) reportó un IC_{50} para diprotina A, de 24.7 μ M y para dos péptidos sintéticos Gly-Pro-Ala-Glu y Gly-Pro-Gly-Ala, valores de 49.6 y 41.9 μ M, respectivamente. Valores que exhiben una alta actividad inhibitoria de DPP-IV en comparación a los péptidos de fuentes alimenticias. Por lo tanto, se presenta como un desafío constante el mejorar juntamente con el avance de técnicas cromatográficas, la búsqueda de

péptidos inocuos inhibidores de DPP-IV a partir de fuentes naturales (vegetal, animal y microbiológico).

Haciendo un resumen de lo expuesto en el trabajo experimental, se tiene que la purificación del hidrolizado proteico de tarwi consistió en seleccionar a lo largo del proceso establecido, las fracciones con las mejores propiedades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante, iniciándose para ello con el proceso de ultrafiltración que permitió seleccionar la fracción del permeado de la membrana de 3 kDa, que posteriormente se continuó purificando por cromatografía de filtración en gel, obteniendo cuatro fracciones (I, II, III y IV), siendo las dos últimas fracciones F III y F IV las que presentaron propiedades multifuncionales: antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante, notablemente mejoradas respecto al hidrolizado proteico de tarwi, en particular la F IV. La Tabla 8 muestra con mayor detalle los resultados del proceso de purificación a partir del hidrolizado proteico de tarwi (Anexos 11, 12 y 13).

Tabla 8: Resumen del proceso de purificación del hidrolizada proteico de tarwi*.

Tratamiento	Actividad antioxidante (μmol TE/mg)	Valor IC₅₀ para la ECA (mg/mL)	Valor IC₅₀ para la DPP-IV (mg/mL)
Hidrolizado proteico de tarwi	1.85 ± 0.016 ^d	0.103 ± 0.012 ^b	3.12 ± 0.081 ^b
Permeado 10kDa	1.67 ± 0.02 ^{cd}	0.13 ± 0.01 ^{bc}	5.92 ± 0.27 ^c
Permeado 3kDa	1.89 ± 0.04 ^d	0.11 ± 0.00 ^b	3.71 ± 0.48 ^b
F I	0.93 ± 0.08 ^a	0.14 ± 0.05 ^{bc}	ND
F II	1.68 ± 0.28 ^{cd}	0.15 ± 0.01 ^{bc}	6.71 ± 2.69 ^c
F III	3.82 ± 0.02 ^e	0.05 ± 0.01 ^a	1.07 ± 0.13 ^a
F IV	6.41 ± 0.25 ^f	0.06 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.01 ^a

*Promedio de tres repeticiones ± DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ($p < 0.05$). N.D: no detectado a dosis ≤ 9 mg/mL.

Finalmente destacar que el procedimiento de purificación juega un papel crucial en la búsqueda e identificación de péptidos bioactivos, así por ejemplo el uso de técnicas cromatográficas mucho más específicas en cuanto al fraccionamiento de los péptidos, como es el caso en la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) o la

cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), que permiten separar e identificar secuencias de péptidos bioactivos, que luego de un profundo análisis de su bioactividad a través de métodos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, podrían reemplazar a fármacos sintéticos. Según Ajibola *et al.* (2013) y Soares de Castro y Sato (2015) los fármacos sintéticos pueden provocar diversos efectos negativos como alergias, reducida función renal, erupciones cutáneas y angiodemas. Sobre ello, Uhlig *et al.* (2014) mencionan que los péptidos bioactivos naturales presentan ventajas competitivas sobre los fármacos como la baja o nula toxicidad inclusive en altas concentraciones de péptido. Sin embargo, para evidenciar cualquier reacción a nivel fisiológico en humanos, es fundamental tener en cuenta la dosis necesaria respecto a la respuesta proyectada.

4.2.3 Electroforesis SDS-PAGE

El perfil de peso molecular de las fracciones provenientes de la purificación del hidrolizado proteico de tarwi se determinaron mediante SDS-PAGE (Figura 8), los pesos moleculares calculados se muestran en la Tabla 9.

Se analizaron un total de siete muestras, el hidrolizado proteico de tarwi, los permeados obtenidos por ultrafiltración de membranas de tamaño de corte de 10 y 3 kDa y las fracciones F I, F II, F III y F IV procedentes de la cromatografía de filtración en gel, todas ellas obtenidas a lo largo del proceso de purificación. Los resultados muestran que según avanza el proceso de purificación las bandas de alto peso molecular desaparecen, mientras que los péptidos inferiores a 10 kDa aumentan hasta que las bandas detectadas mediante la tinción con azul brillante G en F IV son bastantes tenues, mientras que en la F I exhiben manchas notorias, posiblemente debido a la concentración de la muestra.

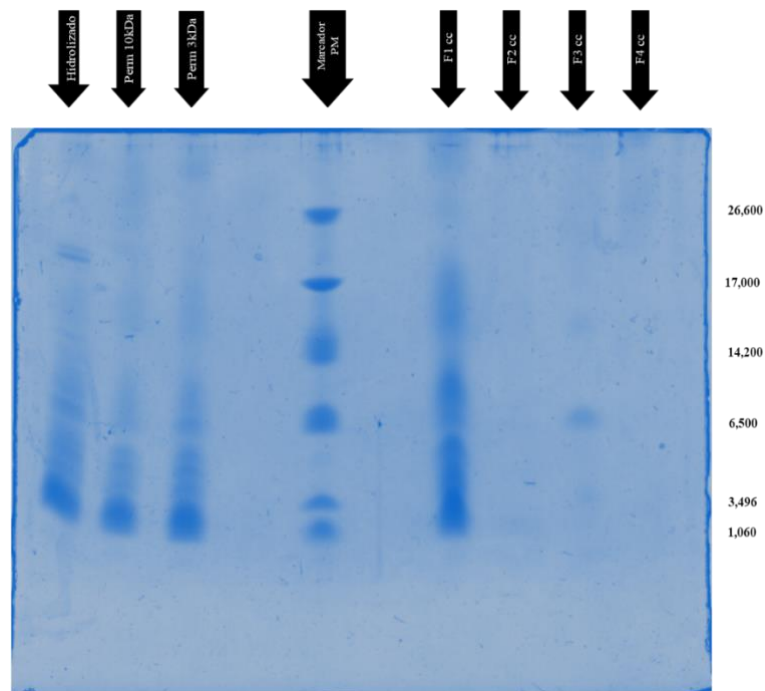


Figura 8: Perfil electroforético de las fracciones obtenidas del proceso de purificación del hidrolizado proteico de tarwi.

Tabla 9: Pesos moleculares de las fracciones obtenidas del proceso de purificación del hidrolizado proteico de tarwi.

Número de bandas	Hidrolizado proteico de tarwi	Permeado 10 kDa	Permeado 3 kDa	F I	F II	F III	F IV
1	21.68	8.14	9.10	9.09	6.31	15.18	N.D.*
2	20.42	6.5	7.83	6.67	1.22	6.54	
3	14.88	4.97	6.36	5.01		3.71	
4	14.24	4.61	4.95	2.36		3.49	
5	11.62	3.96	4.44				
6	9.63	2.25	3.90				
7	7.78		1.72				
8	7.39						
9	5.58						
10	5.26						
11	4.52						
12	3.74						

*ND: No detectado.

La muestra del hidrolizado de tarwi presentó 12 bandas con pesos moleculares entre 21.68 y 3.74 kDa. En los permeados de 10 kDa y 3 kDa se tuvo seis y siete bandas, respectivamente, ambas fracciones resultaron ser muy similares con pesos entre: 8.14 a 2.25 kDa y 9.10 a 1.72 kDa, respectivamente. Las fracciones F II y F III exhiben cuatro y dos bandas parcialmente visibles con pesos moleculares entre: 6.31 a 1.22 kDa y 15.18 a 3.49 kDa, respectivamente (Tabla 9) y en la F IV no se muestran bandas visibles, lo que corroboraría la existencia de péptidos menores a 1 kDa. Estos valores en bajos pesos moleculares demuestran la razón por qué las fracciones que exhibieron mejores actividades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante destacan en F III y F IV.

Respecto a los pesos moleculares, Erdmann *et al.* (2008), citados por Alvarado (2012), señalan que los péptidos antioxidantes oscilan entre 4 a 20 kDa. Chen *et al.* (2021) realizó un estudio de cuatro péptidos: ITTNPYDY (Ile-Thr-Thr-Asn-Pro-Tyr-Asp-Tyr), IGWSPLGSL (Ile-Gly-Trp-Ser-Pro-Leu-Gly-Ser-Leu), ITTNPYDYHY (Ile-Thr-Thr-Asn-Pro-Tyr-Asp-Tyr-His-Tyr) y LRVAPEEHPTL (Leu-Arg-Val-Ala-Pro-Glu-Glu-His-Pro-Thr-Leu), a partir de hidrolizado de proteína miofibrilar de pollo y determinó que los pesos moleculares oscilaban entre 928 y 1,286 Da, que coincidió con el punto de vista que los péptidos antioxidantes constaban de 3 a 16 residuos de aminoácidos con pesos moleculares menor a 1800 Da (Samaranayaka y Li-Chan 2011). Así mismo, Yang *et al.* (2018) identificaron dos péptidos con fuerte actividad antioxidante, Tyr-Leu (YL) y Phe-Tyr (FY) con un peso molecular de 294.33 y 328.33 Da, respectivamente en un hidrolizado de semilla de perilla (*Perilla frutescens* L. Britton). Estos reportes son consistentes en la presencia de péptidos con pesos moleculares pequeños y una relación composición-estructura que podría determinar el potencial de su actividad antioxidante.

Ngo-Son y Katekaew (2019) purificaron hidrolizados de proteína animal para detectar péptidos inhibidores de ECA, mediante cromatografía de intercambio iónico seguido por RP-HPLC de dos pasos, y análisis de secuencias mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), logrando identificar dos secuencias de péptidos inhibidores de la ECA con actividad elevada, el primero GVAAN (Gly-Val-Ala-Ala-Asn) y LHALLL (Leu-His-Ala-Leu-Leu-Leu) con pesos de 431.25 y 679.52 Da, respectivamente. Así mismo Lin *et al.* (2018) encontraron 4 péptidos, WV (Trp-Val), VW (Val-Trp), IW (Ile-Trp) y LW (Leu-Trp), inhibidores de ECA del hidrolizado de proteínas de *Chlorella sorokiniana* cuyos pesos moleculares oscilaron entre 270 y 340 Da. Otro estudio por

Famuwagun *et al.* (2020) reportaron que fracciones purificadas por ultrafiltración a partir de hidrolizados de hojas de calabaza de < 1 y 1-3 kDa fueron los mejores eliminadores de radicales libres y quelantes metálicos, además poseían fuertes actividades inhibitorias contra la α -amilasa, la α -glucosidasa y la ECA, asimismo el análisis de secuencia de péptidos demostró que los hidrolizados de hoja de calabaza consistían en dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos con pesos moleculares inferiores a 500 Da. Estos valores respecto a tamaños son consistentes a lo informado por Yamamoto *et al.* (2017) que indica que los péptidos inhibidores de la ECA generalmente contienen de dos a 12 aminoácidos y sus pesos moleculares varían de 150 a 800 Da. Sin embargo, Valenzuela *et al.* (2013) encontraron en hidrolizados de quinua fracciones con pesos moleculares entre 8.8 y 72.0 kDa, mientras que, Nongonierma *et al.* (2015) para la misma materia prima, encontraron fracciones entre 6.5 y 66 kDa con altos valores de inhibición de la ECA, valores cercanos a los encontrados en el presente estudio, correspondiente a las fracciones III y IV y también con alta actividad inhibidora de la ECA.

Para el caso de los péptidos hipoglucemiantes, Li-Chan *et al.* (2012) en la fracción purificada por ultrafiltración y HPLC a partir de hidrolizado de piel de Salmón, identificaron dos péptidos con mayor actividad inhibitoria DPP-IV, donde las secuencias de aminoácidos fueron GPAQ (372.4 Da, Gly-Pro-Ala-Gln) y GPGA (300.4 Da, Gly-Pro-Gly-Ala), con pesos moleculares similares a los encontrados en el mismo rango de los péptidos antihipertensivos, probablemente debido a que existe una fuerte semejanza en el reconocimiento por parte de las células diana. La patente WO 2006/068480 informó que 21 péptidos fueron capaces de inhibir la actividad de DPP-IV y todos ellos mostraban un carácter hidrofóbico y tenían una longitud que variaba de tres a siete residuos de aminoácidos, y en particular, mostraban la presencia de un residuo Pro dentro de la secuencia (Pieter 2006). Por otra parte, Velarde-Salcedo *et al.* (2013), confirman la presencia de dos tipos de péptidos inhibidores de DPP-IV encriptados en las proteínas de almacenamiento de semillas de amaranto, los péptidos cortos como IPI (Ile-Pro-Ile) con pesos moleculares que oscilan de 270 a 340 Da y los péptidos de más de 13 residuos con pesos moleculares entre 1.5 kDa y 2.5 kDa, estos últimos valores más cercanos al presente estudio.

V. CONCLUSIONES

- La ultrafiltración como etapa de purificación de los péptidos, obtenidos mediante hidrólisis de la proteína del tarwi con Alcalasa y Neutrasa (por 180 min a 50 °C), empleando membranas de corte de 10 y 3 kDa, dio como resultado un alto valor de actividad antioxidante y bajo valor IC_{50} para la enzima convertidora de la angiotensina y la dipeptidil peptidasa IV en el permeado < 3 kDa comparado con el < 10 kDa.
- La cromatografía de filtración en gel permitió separar en cuatro fracciones: F I, F II, F III y F IV el permeado < 3 kDa del hidrolizado proteico de tarwi, destacando entre todas ellas, las propiedades antioxidantes, antihipertensivas e hipoglicemiantes, las fracciones: F III y F IV, evidenciaron valores de 3.82 y 6.41 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína, valores de IC_{50} para la ECA, de 0.05 y 0.06 mg/mL y valores IC_{50} para la DPP-IV de 1.07 y 0.32 mg/mL, respectivamente.
- La electroforesis SDS-PAGE, reveló que el hidrolizado proteico de tarwi estaba compuesto por péptidos con pesos moleculares entre 21.68 y 3.74 kDa, los permeados de la etapa de ultrafiltración < 10 kDa y 3 kDa resultaron ser muy similares en distribución de pesos moleculares entre 1.72 a 9.10 kDa; mientras que las fracciones F II y F III exhibieron bandas parcialmente visibles con pesos moleculares entre 6.31 a 1.22 kDa y 15.18 a 3.49 kDa respectivamente, y en la F IV no se observaron bandas parcialmente visibles, lo que indicaría la existencia de péptidos menores a 1 kDa.
- La estrategia de purificación y concentración de péptidos y la evaluación de las propiedades bioactivas en las fracciones obtenidas, permitió conocer más sobre la estructura de los péptidos y su actividad, como etapa previa a su posterior identificación, síntesis y producción.

VI. RECOMENDACIONES

- Proceder a la identificación de los péptidos del hidrolizado proteico de tarwi mediante el empleo de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC MS/MS), para luego sintetizarlos y proceder a corroborar las propiedades bioactivas evaluadas en este estudio: antioxidantes, antihipertensivas e hipoglucemiantes.
- Realizar estudios de dinámica molecular con los péptidos identificados en el hidrolizado proteico de tarwi, para conocer el mecanismo de inhibición de los péptidos frente a las enzimas relacionadas con la hipertensión (enzima convertidora de la angiotensina) y la hiperglucemia (dipeptidil peptidasa IV).
- Evaluar el empleo de otras técnicas cromatográficas para la purificación de los péptidos del tarwi, que permitan obtener fracciones con propiedades bioactivas mejoradas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D; Andrews, R. 1970. An introduction to chromatography. Madrid, España, Alhambra. s.p.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Agostoni, A.; Cicardi, M. 2001. Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Safety*, 24(8), 599-606. Disponible en <http://dx.doi.org/10.2165/00002018-200124080-00004>. PMID:11480492.
- Ahrén, B; Gomis, R; Standl, E; Mills, D; Schweizer, A. 2004. Twelve- and 52-week efficacy of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor LAF237 in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(12), 2874–2880. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.12.2874>
- Aluko, R. 2019. Food protein-derived renin-inhibitory peptides: In vitro and in vivo properties. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12648. Disponible en <https://doi.org/10.1111/jfbc.12648>
- Alvarado, C. 2012. Aislamiento y aplicación de péptidos bioactivos del lactosuero en un yogurt funcional. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia de los Alimentos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Babini, E; Tagliazucchi, D; Martini, S; Dei Più, L; Gianotti, A. 2017. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chemistry*, 228, 186–196. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.143>

- Bailey, C; Tahrani, A; Barnett, A. 2016. Future glucose-lowering drugs for type 2 diabetes. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 4(4), 350–359. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00462-](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00462-)
- Benitez, R; Ibarz, A; Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 42(2):5-13.
- Bhaskar, B; Ananthanarayan, L; Jamdar, S. 2019. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. *LWT*, 103, 155–161. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.059>
- Blanco-Galdos O. 1982. Genetic variability of tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Schriftenreihe der Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit*, 33–49.
- Borja, J. 2014. “Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus* sp. Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Boschin G, Scigliuolo, G; Resta, D; Arnoldi, A. 2014. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry Elsevier Ltd.* 145:34–40
- Bouhallab, S; Mollé, D; Léonil, J. 1993. Continuous hydrolysis of β -casein in a membrane reactor: Preparation of a bioactive peptide. *Biotechnology Letters*, 15(7), 697–702. Disponible en <https://doi.org/10.1007/bf01080142>
- Canahua A; Roman P. 2016. Tarwi, leguminosa andina de gran potencial. [(accessed on 13 January 2022)]; *Rev. De Agroecol. LEISA*. 2016 32:2. Available online: <https://www.servindi.org/actualidad-opinion/27/07/2016/tarwi-leguminosa-andina-de-gran-potencial>.
- Canelo, F; López, I; López, E; Perales, L. 2009. Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones Industriales. Editorial Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Buenos Aires, Argentina.

- Cañahua, A; Mujica, A. 2014. Granos andinos: Patrimonio y soporte de la seguridad alimentaria y nutricional sostenibles. *Agroenfoque*, 29(194), 44-51.
- Carrillo, J; Candia, M; Lugo, R; Espinoza, E; Noriega, J. 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus* 8:19 - 26.
- Carvajal-Larenas, F; Linnemann, A; Nout, M; Koziol, M; Van Boekel, M. 2016. *Lupinus mutabilis*: composition, uses, toxicology, and debittering. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1454–1487. doi: 10.1080/10408398.2013.772089
- Chan, K; Decker, E; Feustman, C. 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci* 34(4):403–426
- Chen, H; Muramoto, K; Yamauchi, F; Fujimoto, K; Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soy bean protein. *J Agric Food Chem* 46(1):49–53
- Chen, J; Wang, Y; Ye, R; Wu, Y; Xia, W. 2013. Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Food Chemistry*, 141(4), 3329-3334. foodchem.2013.06.048. PMID:23993489. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j>.
- Chen, J; Xu, Y; Ge Z; Zhu, W; Xu, Z; Li, C; 2015. Structural elucidation and antioxidant activity evaluation of key phenolic compounds isolated from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seeds, *J. Funct. Foods*, 17, 872–880.
- Chen, J; Yan, Y; Zhang, L; Zheng, J; Guo, J; Li, R; Zeng, J. 2021. Purification of novel antioxidant peptides from myofibrillar protein hydrolysate of chicken breast and their antioxidant potential in chemical and H₂O₂-stressed cell systems. *Food & Function*, 12(11), 4897–4908. <https://doi.org/10.1039/d1fo00579k>
- Chi, C; Wang, B; Hu, F; Wang, Y; Zhang, B; Deng, S; Wu, C. 2015. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International* 73:124–129.

- Chirinos, R; Cerna, E; Pedreschi, R; Calsin, M; Aguilar-Galvez, A; Campos, D. 2020. Multifunctional in vitro bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chemistry*, cche.10382. Disponible en <https://doi.org/10.1002/cche.10382>
- Chirinos-Arias, M. 2015. Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. *Bio Ciencias*, 3(3), 163-172.
- Cisneros, M. 2017. Purificación de péptidos bioactivos de quinua (*Chenopodium quinoa*) con capacidad antioxidante y antihipertensiva. Tesis Ing. UNALM. Lima, Perú. 117 p.
- Clark, R; Johnson, S. 2002. Sensory acceptability of foods with added Lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. *Journal of Food Science*, 67(1), 356–362. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11410.x>
- Collins, F; Howell, R. 1957. Variability of linolenic and linoleic acids in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(10), 491–493. Disponible en <https://doi.org/10.1007/bf02638073>
- Cui, Z. 2005. Protein separation using ultrafiltration: An example of multi-scale complex systems. *China Particuology* 3(6):343-348.
- Cummins, P.M; Dowling, O; O'Connor, B.F. 2011. Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase Protein Chromatography. In: Walls D, Loughran ST, editors: Humana Press. p 215-228.
- Cutler, P. 2008. Size-Exclusion Chromatography Molecular Biomethods Handbook. In: Walker JM, Rapley R, editors: Humana Press. p 719-729.
- Daliri, E; Lee, B; Oh, D. 2017. Current trends and perspectives on Bioactive Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12:1-12.
- Daliri, E; Lee, B; Park, M; Kim, J; Oh, D. 2018. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein isolates fermented by *Pediococcus*

pentosaceus SDL1409. LWT, 93, 88–93. Disponible en <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.026>

Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. Ii. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 404–427. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>

De la cruz, N. 2018. Caracterización Fenotípica y de Rendimiento de Ecotipos de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.), Bajo Condiciones de Callejón de Huaylas - Ancash. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Callejon de Huaylas, Ancash.

Del Carmen Millán-Linares, M; Bermúdez, B; del Mar Yust, M; Millán, F; Pedroche, J. 2014. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *Journal of Functional Foods*, 8, 224–233.

Elias, R; Kellerby, S; Decker, E. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci* 48(5):430–441

Encyclopedia Britannica. Renin-angiotensin system (en línea). Consultado 20 nov. 2017. Disponible en <https://www.britannica.com/science/renin-angiotensin-system>

Falconí C. 2012. *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. [Ph.D. dissertation]. [Wageningen (NL)]: Wageningen University.

Famuwagun, A; Alashi, A; Gbadamosi, S; Taiwo, K; Oyedele, J; Adebooye, O; Aluko, R. 2020. In vitro characterization of fluted pumpkin leaf protein hydrolysates and ultrafiltration of peptide fractions: Antioxidant and enzyme-inhibitory properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(4), 429–443. Disponible en <https://doi.org/10.31883/pjfn/130401>.

Fanali, S; Haddad, P; Poole, C; Riekkola, M. 2017. Liquid Chromatography. Volume 2. Applications. Amsterdam, Netherlands. Elsevier.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2019. [(accessed on 15 February 2022)]. FAOSTAT Data, Lupin Yield, Australia and Western Europe, Crops and livestock products. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Fornasini, M; Castro, J; Villacrés, E; Narváez, L; Villamar M; Baldeón M. 2012. Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutr. Hosp.* 27, 425–433.
- Galanakis, C. 2014. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. A Review: *Food Science and Technology* 20:1-20
- Gangopadhyay, N; Wynne, K; O' Connor, P; Gallagher, E; Brunton, N; Rai, D; Hayes, M. 2016. In silico and *in vitro* analyses of the angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeus vulgare*) protein concentrates. *Food Chemistry* 203:367-374.
- Girgih, A; He, R; Hasan, F; Udenigwe, C; Gill, T; Aluko, R. 2015. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>
- Guang, C; Phillips, R. 2009. Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1021/jf900494d>. PMID:19449887.
- Gulisano, A; Alves, S; Martins, J; Trindade, L. 2019. Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1385. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01385>
- Guo, L; Harnedy, P; Li, B; Zhang, Z; Hou, H; zhao, X; Fitzgerald, R. 2015. *In vitro* assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Science and Food Agriculture* 95(7):1514 - 1520.

- Guo, P; Qi, Y; Zhu, C; Wang, Q. 2015. Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds. *Journal of Functional Foods*, 19, 394-403.
- Harnedy, P; FitzGerald, R. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of functional foods*, 4(1), 6-24.
- Harscoat, C; Raminoso, F; Ronat, E; Vanderesse, R; Marc, I. 2010. Modelling the separation of small peptides by cation-exchange chromatography. *Journal of Separation Science* 33:2447-2457.
- Hartmann, R; Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hayes, M; Mora, L; Hussey, K; Aluko, R. 2016. Boarfish protein recovery using the pH-shift process and generation of protein hydrolysates with ECA-I and antihypertensive bioactivities in spontaneously hypertensive rats. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37:253-260.
- He, R; Ma, H; Zhao, W; Qu, W; Zhao, J; Luo, L; Zhu W. 2012. Modeling the QSAR of ACE-inhibitory peptides with ANN and its applied illustration. *Int. J. Pept.* 2012 doi: 10.1155/2012/620609.
- Herrero, A. 2010. Desarrollo de membranas poliméricas con propiedades antifouling. Proyecto de Fin de Carrera de Ingeniería Técnica Industrial. Departamento de ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química. Universidad Carlos III de Madrid. Madrid, España.
- Hjerten, S. 1962. A new method for the preparation of agarose for gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 62, 445-449. Disponible en [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90224-x](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90224-x)
- Hostettmann, K; Marston, A; Hostettmann, M. 1998. Técnicas de cromatografía preparativa: Aplicaciones en el Aislamiento de productos naturales. Segunda edición. Barcelona, España, Springer. s.p.

- Huang, C.-Y; Wu, C.-H; Yang, J.-I; Li, Y.-H; Kuo, J.-M. 2015. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 671–678. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.06.009>
- Irvine, G.B. 1997. Size-exclusion highperformance liquid chromatography of peptides: a review. *Analytica Chimica Acta* 352, 387-397.
- Ishak, N; Sarbon, N. 2018. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 2–16. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>
- Jacobsen, S; Mujica, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. In Moraes, M; Ollgaard, B; Kvist, L; Borchsenius, F; Balslev, H. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. p. 458-482.
- Janson, J. 2012. *Protein Purification. Principles, high resolution methods and applications*. Third Edition. John Wiley & Sons. New Jersey. EE.UU.
- Jin, H; Lee, J; Kim, D; Kim, K; Lee, G; Choi, S; Chang, P; Paik, H. 2015. Antioxidative and nitric oxide scavenging activity of branched-chain amino acids, *Food Sci. Biotechnol.* 24, 1555–1558.
- Kang, M; Kim, Y; Bolormaa, Z; Kim, M; Seo, G; Lee, J. 2013. Characterization of an Antihypertensive Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from the Edible Mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biomedical Research International* 1-6.
- Kim, S; Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods* 2:1 – 9.
- Korhonen, H; Pihlanto, A. 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Willey-Interscience.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lammi, C; Zanoni, C; Arnoldi, A; Vistoli, G. 2016. Peptides derived from Soy and Lupin protein as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors: In vitro biochemical screening and in silico molecular modeling study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(51), 9601–9606. Disponible en <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04041>
- Langevin, M; Roblet, C; Moresoli, C; Ramassamy, C; Bazinet, L. 2012. Comparative Application of Pressure- and Electrically-driven Membrane Processes for Isolation of Bioactive Peptides from Soy Protein Hydrolysate. *J. Membr. Sci.* 2012, 403–404, 15–24. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.02.005.
- Lederer, E; Lederer, M. 1960. Cromatografía: Revisión de sus principios y aplicaciones. Segunda edición. París, Francia, Elsevier Publishing Company. s.p
- Levison, P. R. (2003). Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 790(1–2), 17–33. Disponible en [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00087-4](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00087-4)
- Levison, R. 2003. Large-scale Ion-exchange Column Chromatography of Proteins: Comparison of Different Formats. *J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 790, 17–33. doi: 10.1016/s1570-0232(03)00087-4.
- Li-Chan, E; Hunag, S; Jao, C; Ho, K; Hsu, K. 2012. Peptides derived from atlantic salmón skin gelatin as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973–978. Disponible en <https://doi.org/10.1021/jf204720q>
- Lin, Y; Chen, G; Yeh, C; Song, H; Tsai, J. 2018. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and the antihypertensive effect of *Chlorella sorokiniana* protein hydrolysates. *Nutrients*, 10(10), 1397. Disponible en <https://doi.org/10.3390/nu10101397>
- Lowry, O; Rosebrough, N; Farr, A; Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Lu, J; Ren, D; Xue, Y; Sawano, Y; Miyakawa, T; Tanokura, M. 2010. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7166–7171. Disponible en <https://doi.org/10.1021/jf100193f>
- Lucas, M; Stoddard, F; Annicchiarico, P; Frias, J; Martinez-Villaluenga, C; Sussmann, D. 2015. The future of lupin as a protein crop in Europe. *Front Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00705
- Mahmoodani, F; Ghassem, M; Babji, A; Yusop, S; Khosrokhavar, R. 2014. ACE Inhibitory Activity of Pangasius Catfish (*Pangasius Sutchi*) Skin and Bone Gelatin Hydrolysate. *J. Food Sci. Technol.* 51, 1847–1856. doi: 10.1007/s13197-012-0742-8.
- Maldonado, A; Jorrín, J. 2010. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* (en línea). Consultado 25 abr. 2022. Disponible en <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>.
- Malomo, S; Onuh, J; Girgih, A; Aluko, R. 2015. Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients*, 7(9), 7616–7632. Disponible en <https://doi.org/10.3390/nu7095358>
- Mannur, I; Norizah M. 2020. A Review on Purification and Characterization of Anti-proliferative Peptides Derived from Fish Protein Hydrolysate, *Food Reviews International*, doi: 10.1080/87559129.2020.1812634.
- Mayolo-Deloisa, K; Martínez, L. M; Rito-Palomares, M. 2012. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 415–429. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000300006
- Mazón N. 2018. El Chocho o tarwi Como Recurso Genético de la Región Andina [Seminario Online] Interaprendizaje—IPDRS; Quito, Ecuador: Oct 29, 2018. [(accessed on 20 January 2022)]. Available online: <https://bit.ly/2rsbfFF>.

- McDonald, J. 1985. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification, *Histochem J.* 17. 773-85, <https://doi.org/10.1007/BF01003313>.
- Montero Contreras, Carmen. 2018. Granos Andinos. Nota Técnica de Granos Andinos, I, 1-10.
- Mosquera, M. 2014. Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Tesis Doc. Madrid, España, UCM.
- Mulero, J; Zafrilla, P; Martínez-Cachá, A; Leal, M; Abellán, J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 23(5): 219-227.
- Muñoz, E; Luna-Vital, D; Fornasini, M; Baldeón, M; Gonzalez de Mejia, E. 2018. Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucose uptake and reduced gluconeogenesis in vitro. *Journal of Functional Foods*, 45, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.021>
- Murase, H; Nagao, A; Terao, J. 1993. Antioxidant and emulsifying activity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(long-chainacyl) carnosine. *J Agric Food Chem* 41(10):1601–1604
- Ngo, D; Ryu, B; Kim, S. 2014. Active peptides from skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-I converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. *Food Chemistry*, 143, 246-255. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.067>. PMID:24054237
- Ngo-Son, A; Katekaew, S. 2019. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory derived from crocodile blood hydrolysates. *Food Science and Technology*, 39(4), 818–823. <https://doi.org/10.1590/fst.08318>
- Nongonierma, A; Le, M; Dubrulle, C; Barre, C; Fitzgerald, R. 2015. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Cereal Science* 65:112-118.

- Nwachukwu, I; Girgih, A; Malomo, S; Onuh, J; Aluko, R. 2014. Thermoase-Derived Flaxseed Protein Hydrolysates and Membrane Ultrafiltration Peptide Fractions Have Systolic Blood Pressure-Lowering Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18131–18147. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms151018131>.
- Ochoa, K. 2018. “PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE UN HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen): CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA” [Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias]. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Ojiugo, F. 2014. Bioactive molecules in plant foods. New York, United States of America. Nova Science.
- Ono, S; Hosokawa, M; Miyashita, K; Takahashi, K. 2005. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006; 41:383–386. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01080
- Onuh, J; Girgih, A; Malomo, S; Aluko, R; Aliani, M. 2015. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 14, 133–143. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.031>
- Oseguera-Toledo, M; Gonzalez de Mejia, E; Amaya-Llano, S. 2015. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 76(Pt 3), 839–851. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.046>.
- Pate, J; Williams, W; Farrington P. 1985. “Lupin (*Lupinus spp.*),” in Grain Legume crops. Eds. Summerfield R. J., Roberts E. H. (London, UK: Collins), 699–746 157 refs, illus.
- Perez Ramos, K. 2019. “Elaboración de un bocadito extruido de quinua, tarwi y fécula de camote para niños escolares” (UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA

MOLINA FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS). Retrieved from:
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3894>.

Pérez, C. M; Santos, J. S; Alquicira, E. P; Tenorio, L. M. D. 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *Nacameh*, 9(2), 77–96. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6020409>

Picot, L; Bordenave, S; Didelot, S; Fruitier-Arnaudin, I; Sannier, F; Thorkelsson, G; Piot, J. M. 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41(5), 1217-1222.

Picot, L; Ravallec, R; Fouchereau-Perón, M; Vandanjon, L; Jaouen, P; Chaplain-Derouiniot, M; Bourseau, P. 2010. Impact of Ultrafiltration and Nanofiltration of an Industrial Fish Protein Hydrolysate on Its Bioactive Properties. *J. Sci. Food. Agric.* 1819–1826, 2010(90). doi: 10.1002/jsfa.4020.

Pieter, B. 2006. Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use. WO 2006/068480 200.

Prakash, D; Misra, P. 1988. Protein content and amino acid profile of some wild leguminous seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 38(1), 61–65. Disponible en <https://doi.org/10.1007/bf01092311>

Prior, R; Wu X; Kschaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* 534290e4302.

Qian, Z; Jung, W; Kim, S. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour Technol* 99(6):1690–1698

Rabilloud, T. 1992. A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis*, 13(1), 429–439. Disponible en <https://doi.org/10.1002/elps.1150130190>

- Rajapakse, N; Mendis, E; Jung, W; Je, J; Kim, S. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int.*38:175–182.
- Raju, B; Tiwari, A; Kumar, J; Ali, A; Agawane, S; Saidachary, G; Madhusudana, K. 2010. Alpha glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 358-365.
- Ramírez, M. 2015. Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos. Barcelona, España: *OmniaScience*.
- Rojas, J. 2016. El cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Estado Plurinacional de Bolivia. *Revista Científica de Investigación INFO-INIAF*, 1(7), 88-100.
- Saadi, S; Saari, N; Anwar, F; Abdul, A; Mohd, H. 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Journal Biotechnology Advances* 33:80-116.
- Salunke, P; Marella, C; Metzger, L 2021. Microfiltration and ultrafiltration process to produce micellar casein and milk protein concentrates with 80% crude protein content: Partitioning of various protein fractions and constituents. *Dairy*, 2(3), 367–384. Disponible en <https://doi.org/10.3390/dairy2030029>
- Samaranayaka A; Li-Chan E. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications, *J. Funct. Foods*, 3, 229–254.
- Sarmadi, B; Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Schägger, H. 2003. SDS electrophoresis techniques. in *Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide* 2nd edn. (eds. Hunte, C., von Jagow, G. & Schägger, H.) 4.85–4.103 (Academic, San Diego, California)
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. Disponible en <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schägger, H; von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100

- kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. Disponible en [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Segura, M; Chel, L; Betancur, D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista chilena de nutrición* 37(3):386-391.
- Segura-Campos, M; Chel, L; Betancur, D. 2013. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona, España. Omniascience.
- Shabestarian, H; Asoodeh, A; Homayouni-Tabrizi, M; Hossein-Nejad- Arian, H. 2017. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory properties of GL-9 peptide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12838. Disponible en <https://doi.org/10.1111/jfpp.12838>
- Shaik, M; Sarbon, N. 2020. A review on purification and characterization of anti-proliferative peptides derived from fish protein hydrolysate. *Food Reviews International*, 1–21. Disponible en <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1812634>
- Sharma, D; Gupta, R; Joshi, I. 2014. Nutrient analysis of raw and processed soybean and development of value added soybean noodle. *Invent. J.* 1, 1–5.
- Singh, B; Vij, S; Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171–179. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Singh, G. 2016. Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden into Value-Added Products. Academic Press. Elsevier Inc.
- Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. 2008. Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición. México, CENGAGE Learning. s.p
- Smith, S; Choy, R; Johnson, S; Hall, R; Wildeboer-Veloo, A; Welling, G. 2006. Lupin kernel fiber consumption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent in situ hybridization. *European Journal of Nutrition*, 45(6), 335–341. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0603-1>

- So, P. B. T.; Rubio, P.; Lirio, S. 2016. In Vitro Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition by a Peptide Isolated from *Chiropsalmus Quadrigatus* Haeckel (Box Jellyfish) Venom Hydrolysate. *Toxicon*. 119, 77–83. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.04.050.
- Song, R.; Zhang, K. Q.; Wei, R. B. 2016. In Vitro Antioxidative Activities of Squid (*Ommastrephes Bartrami*) Viscera Autolysates and Identification of Active Peptides. *Process Biochem*. 51, 1674–1682. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.06.015.
- Spolaore, P; Joannis-Cassan, C; Duran, E; Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng*; 101:87–96. doi: 10.1263/jbb.101.87.
- Tapia M. 2015. El Tarwi, Lupino Andino. Tarwi, Tauri, o Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) Corporación Gráfica Universal SAC; Huaylas, Perú. p. 115.
- Tavares, T; Malcata, F. 2016. Encyclopedia of Food and Health: Whey, whey powders and Fermentation of Whey. USA, Elsevier. s.p
- Torruco-Uco, J; Chel-Guerrero, L; Martínez-Ayala, A; Dávila-Ortíz, G; Betancur-Ancona, D. 2009. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris*, Seeds. *LWT - Food Science and Technology* 42, (10) 1597-60.
- Tránsito-López, M. 2006. Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *Revista de la Oficina de Farmacia Ámbito Farmacéutico* 25(5):82-88.
- Trugo, L; Von Baer, D; Von Baer, E. 2003. “LUPIN,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Ed. Caballero, B. (Oxford: Academic Press), 3623–3629. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00717-3
- Tulipano, G; Faggi, L; Nardone, A; Cocchi, D; Caroli, A. 2015. Characterization of the potential of b-lactoglobulin and alactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: in silico and in vitro comparative studies. *International Dairy Journal*, 48, 66–72.
- Ugwu, C; Abarshi, M; Mada, S; Sanusi, B; Nzelibe, H. 2019. Camel and horse milk casein hydrolysates exhibit angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative

- effects in vitro and in silico. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(4), 1595–1604. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-09802-2>
- Valenzuela, C; Abugoch, L; Tapia, C; Gamboa, A. 2013. Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science and Technology* 48:843 - 849.
- Velarde-Salcedo, A; Barrera-Pacheco, A; Lara-González, S; Montero-Morán, G; Díaz-Gois, A; González de Mejia, E; Barba de la Rosa, A. 2013. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food chemistry*, 136(2), 758–764. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.032>.
- Velásquez, M. 2018. Hidrólisis Enzimática de la proteína de kiwicha (*Amaranthus caudatus* Linneaus) para obtener péptidos con propiedades antioxidante y antihipertensiva. Tesis Mg.Sc. Lima, Perú, UNALM.
- Vercruysse, L; Van Camp, J; Smaghe, G. 2005. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (21), 8106-8115.
- Vilcacundo, R; Martínez-Villaluenga, C; Hernández-Ledesma, B. 2017. Release of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *J. Funct. Foods*, 35, 531–539
- Vijaykrishnaraj, M., & Prabhasankar, P. (2015). Marine protein hydrolysates: their present and future perspectives in food chemistry – a review. *RSC Advances*, 5(44), 34864–34877. <https://doi.org/10.1039/c4ra17205a>
- Vioque, J; Millán, F. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.
- Walker, J. M. (Ed.). 1996. *The protein protocols handbook* (Vol. 1996). Springer Science & Business Media.

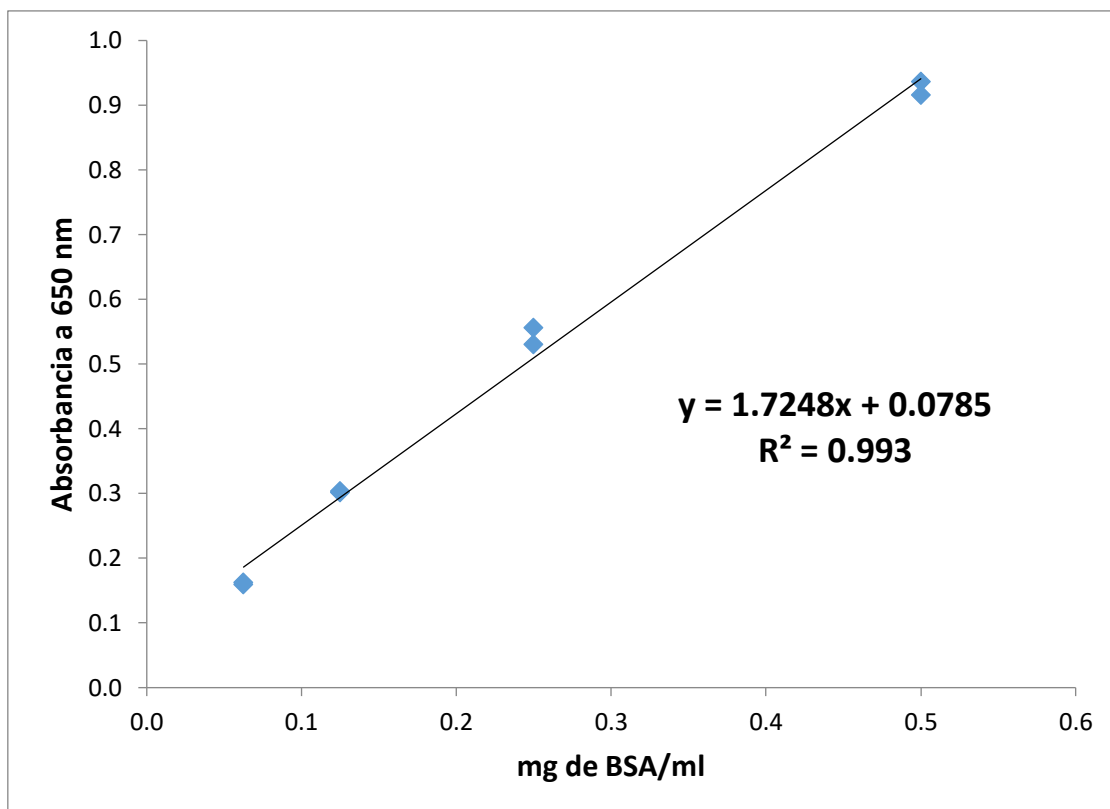
- Wan, C; Yuan, T; Li, L; Kandhi, V; Cech, N; Xie, M; Seeram, N. 2012. Maplexins, new α -glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22: 597.
- Wang, X; Chen, H; Fu, X; Li, S; Wei, J. 2017. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 75, 93–99. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.047>
- Wang, X; Yu, H; Xing, R; Li, P. 2017. Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International*, 2017, 1–16. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>
- Weber, K; Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412. Disponible en [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)94333-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)94333-4)
- What is membrane filtration?* (n.d.). Alfalaval.Us. Retrieved April 29, 2022, Disponible en <https://www.alfalaval.us/products/separation/membranes/what-is-membrane-filtration/>
- Wu, J; Aluko, R; Muir, E. 2002. Improved method for direct high- performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 950, 125 - 130.
- Wu, J; Aluko, R; Nakai, S. 2006. Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732–738. Disponible en <https://doi.org/10.1021/jf051263l>
- Xueqin, W; Huahua, Y; Ronge, X; Pengcheng, L. 2017. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides: Review Article. *BioMed. Res. Int.* 9746720. doi: 10.1155/2017/9746720.

- Yamamoto, D; Takai, S; Miyazaki, M. 2007. Prediction of interaction mode between a typical ACE inhibitor and MMP-9 active site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354:981–984.
- Yan, J; Zhao, J; Yang, R; Zhao, W. 2019. Bioactive peptides with antidiabetic properties: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1909–1919. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14090>
- Yang, J; Hu, L; Cai, T; Chen, Q; Ma, Q; Yang, J; Meng, C; Hong, J. 2018. Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (*Perilla frutescens* L. Britton) seed protein hydrolysates. *PLoS One*, 13(7), e0200021. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200021>
- Yongvanit, P; Pinlaor, S; Bartsch, H. 2012. Oxidative and nitrative DNA damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. *Parasitology International*, 61(1), 130–135. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.011>
- Yu, J; Hu, Y; Xue, M; Dun, Y; Li, S; Peng, N; Liang, Y; Zhao, S. 2016. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(7):1216 – 1223.
- Zhang, Q; Tong, X; Li, Y; Wang, H; Wang, Z; Qi, B; Sui, X; Jiang, L. 2019. Purification and characterization of antioxidant peptides from Alcalase-hydrolyzed soybean (*Glycine max* L.) hydrolysate and their cytoprotective effects in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(20), 5772–5781. Disponible en <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01235>
- Zhang, Y; Duan, X; Zhuang, Y. 2012. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13–21. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>
- Zhang, Y; Liu, H; Hong, H; Luo, Y. 2018. Purification and identification of dipeptidyl peptidase IV and angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) muscle hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 245(1), 243–255. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3157-6>.

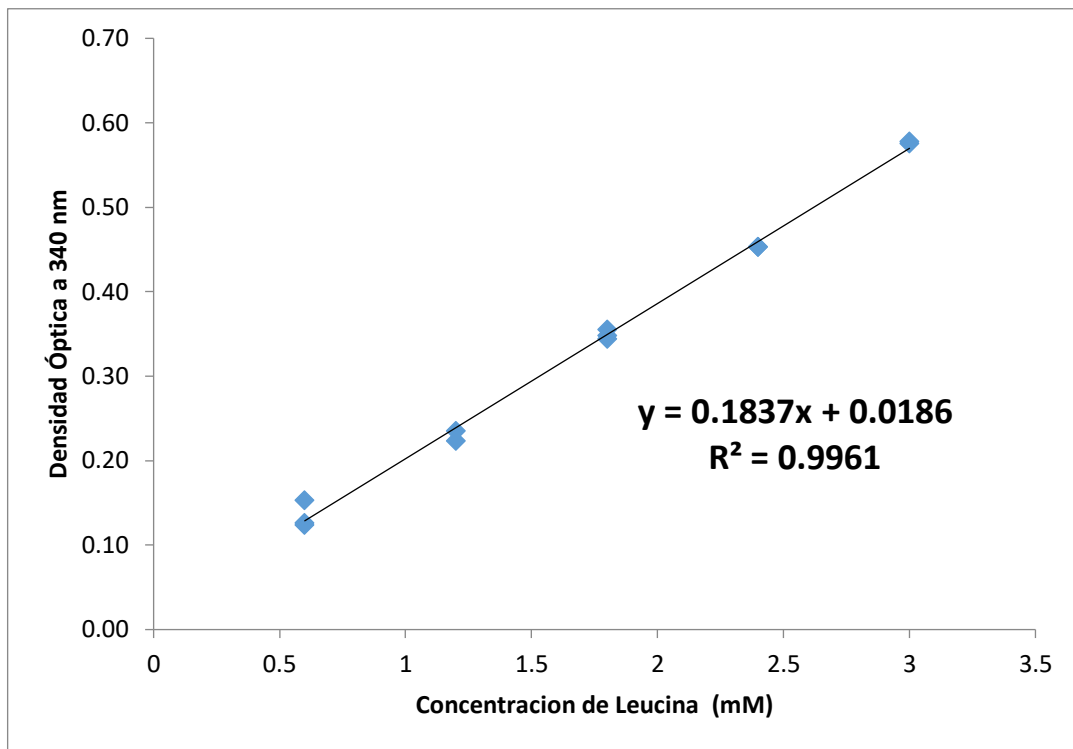
Zou, Z; Wang, M; Wang, Z; Aluko, R; He, R. 2020. Antihypertensive and antioxidant activities of enzymatic wheat bran protein hydrolysates. *Journal of food biochemistry*, 44(1), e13090. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13090>.

VIII. ANEXOS

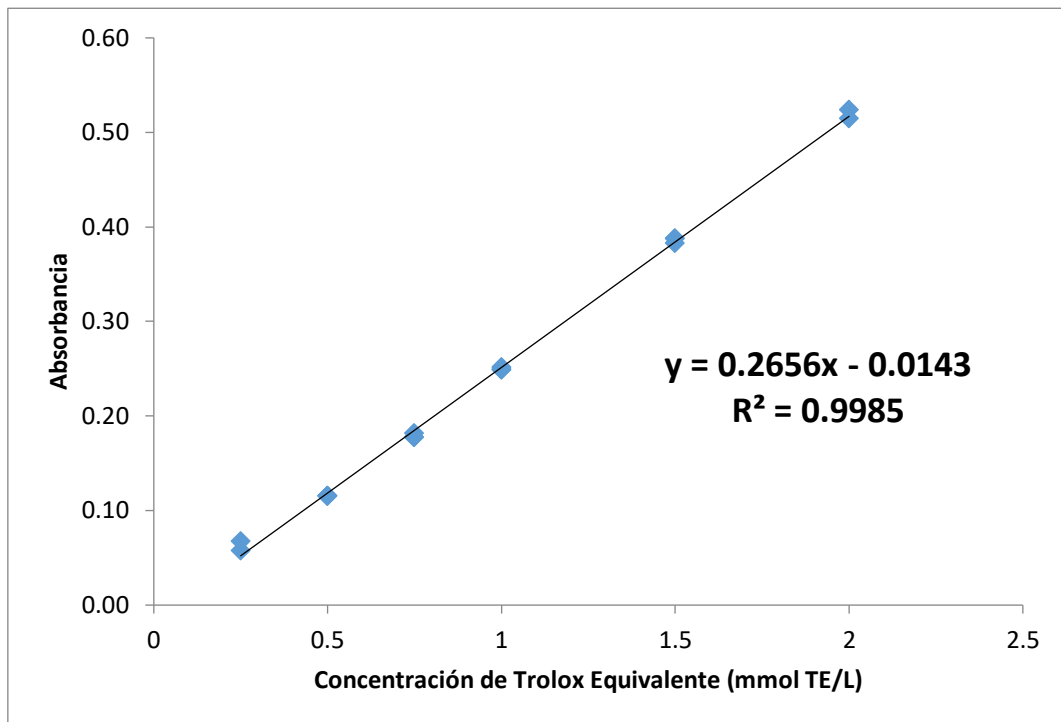
Anexo 1: Curva estándar de proteína soluble



Anexo 2: Curva estándar de leucina para la determinación de grado de hidrólisis



Anexo 3: Curva estándar de actividad antioxidante ABTS



Anexo 4: Anova simple –actividad antioxidante por *cut off*

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 15

ANOVA

Actividad Antioxidante

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,685	4	,171	205,388	,000
Dentro de grupos	,008	10	,001		
Total	,693	14			

Actividad Antioxidante

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Retentado 3kDa	3	1,3367			
Retentado 10kDa	3		1,4767		
Permeado 10kDa	3			1,6733	
HPT	3				1,8467
Permeado 3kDa	3				1,8967
Sig.		1,000	1,000	1,000	,060

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 5: Anova simple – inhibición de la ECA-I (%) a concentración 0.75 mg/ml por cut off

Variable dependiente: Inhibición de la ECA-I (%) a concentración 0.75 mg/mL

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5

ANOVA

Inhibición ECA-I

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	412,610	4	103,153	32,658	,000
Dentro de grupos	31,586	10	3,159		
Total	444,196	14			

Inhibición ECA-I

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Retentado 10kDa	3	70,5833		
Retentado 3kDa	3		79,6033	
Permeado 10kDa	3		80,3500	
Permeado 3kDa	3		81,5767	
HPT	3			86,8067
Sig.		1,000	,223	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 6: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) por cut off

Variable dependiente: Valor IC₅₀- ECA-I (mg/mL)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5

ANOVA

Valor IC₅₀ ECA-I

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,029	4	,007	39,676	,000
Dentro de grupos	,002	10	,000		
Total	,031	14			

Valor IC₅₀ ECA-I

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HPT	3	,10333		
Permeado 3kDa	3	,10633		
Permeado 10kDa	3	,12633		
Retentado 3kDa	3		,15733	
Retentado 10kDa	3			,22200
Sig.		,074	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 7: Anova simple – inhibición de DPP-IV (%) a concentración 3 mg/ml por *cut off*

Variable dependiente: Inhibición de **DPP-IV** (%) a concentración 3 mg/mL

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5

ANOVA

Inhibición de DPP-IV

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1030,909	4	257,727	101,821	,000
Dentro de grupos	25,312	10	2,531		
Total	1056,221	14			

Inhibición de DPP-IV

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Permeado 10kDa	3	24,5567		
Permeado 3kDa	3		37,4067	
Retentado 10kDa	3		37,8400	
Retentado 3kDa	3		39,5033	
HPT	3			50,6600
Sig.		1,000	,154	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 8: Anova simple – valor IC₅₀- DPP-IV (mg/ml) por cut off

Variable dependiente: Valor IC₅₀- DPP-IV (mg/mL)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5

ANOVA

Valor IC₅₀ DPP-IV

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14,145	4	3,536	51,624	,000
Dentro de grupos	,685	10	,069		
Total	14,830	14			

Valor IC₅₀-DPPIV

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HPT	3	3,1200		
Retentado 3kDa	3		3,6133	
Permeado 3kDa	3		3,7100	
Retentado 10kDa	3		3,8033	
Permeado 10kDa	3			5,9167
Sig.		1,000	,416	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 9: Anova simple –actividad antioxidante por picos

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Pico

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

ANOVA

Actividad Antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	54,402	3	18,134	499,334	,000
Dentro de grupos	,291	8	,036		
Total	54,693	11			

Actividad Antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
F-I	3	,9300			
F-II	3		1,6800		
F-III	3			3,8233	
F-IV	3				6,4067
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 10: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) por picos

Variable dependiente: Valor IC₅₀- ECA-I (mg/mL)

Factor: Pico

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

ANOVA

Valor IC₅₀-ECA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,022	3	,007	7,400	,011
Dentro de grupos	,008	8	,001		
Total	,030	11			

Valor IC₅₀-ECA

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
F-III	3	,05233	
F-IV	3	,06200	
F-I	3		,13767
F-II	3		,14600
Sig.		,715	,753

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 11: Anova simple – valor IC₅₀- DPP-IV (mg/ml) por picos

Variable dependiente: Valor IC₅₀- DPP-IV (mg/mL)

Factor: Pico

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

ANOVA

Valor IC₅₀-DPPIV

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	73,157	2	36,578	15,130	,005
Dentro de grupos	14,506	6	2,418		
Total	87,663	8			

Valor IC₅₀-DPPIV

Duncan^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
F-IV	3	,3233	
F-III	3	1,0700	
F-II	3		6,7100
Sig.		,578	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 12: Anova simple – actividad antioxidante de las etapas de purificación

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Etapa

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

ANOVA

Actividad Antioxidante

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	71,394	8	8,924	537,489	,000
Dentro de grupos	,299	18	,017		
Total	71,693	26			

Actividad Antioxidante

Duncan^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
F-I	3	,9300					
Retentado 3kDa	3		1,3367				
Retentado 10kDa	3		1,4767	1,4767			
Permeado 10kDa	3			1,6733	1,6733		
F-II	3			1,6800	1,6800		
HPT	3				1,8467		
Permeado 3kDa	3				1,8967		
F-III	3					3,8233	
F-IV	3						6,4067
Sig.		1,000	,200	,083	,065	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

Anexo 13: Anova simple – valor IC₅₀- ECA-I (mg/ml) de las etapas de purificación

Variable dependiente: Valor IC₅₀- ECA-I (mg/mL)

Factor: Etapa

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

ANOVA

Valor IC₅₀-ECA-I

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,063	8	,008	14,751	,000
Dentro de grupos	,010	18	,001		
Total	,073	26			

Valor IC₅₀-ECA-I

Duncan^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
F-III	3	,05233			
F-IV	3	,06200			
HPT	3		,10333		
Permeado 3kDa	3		,10633		
Permeado 10kDa	3		,12633	,12633	
F-I	3		,13767	,13767	
F-II	3		,14600	,14600	
Retentado 3kDa	3			,15733	
Retentado 10kDa	3				,22200
Sig.		,616	,056	,149	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 14: Anova simple – valor IC50- DPP-IV (mg/ml) de las etapas de purificación

Variable dependiente: Valor IC₅₀- DPP-IV (mg/mL)

Factor: Etapa

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

ANOVA

Valor IC₅₀-DPPIV

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	97,275	7	13,896	14,636	,000
Dentro de grupos	15,191	16	,949		
Total	112,466	23			

Valor IC₅₀-DPPIV

Duncan^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
F-IV	3	,3233		
F-III	3	1,0700		
HPT	3		3,1200	
Retentado 3kDa	3		3,6133	
Permeado 3kDa	3		3,7100	
Retentado 10kDa	3		3,8033	
Permeado 10kDa	3			5,9167
F-II	3			6,7100
Sig.		,362	,441	,334

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

Anexo 15: Abreviaturas de nombres, pI y masa de aminoácidos

	Nombre	Código de una letra	Código de tres letras	pI	Masa del residuo (Da)
1.	Alanina	A	Ala	6.02	71.08
2.	Arginina	R	Arg	10.76	156.20
3.	Asparagina	N	Asn	5.41	114.11
4.	Ácido aspártico	D	Asp	2.97	115.09
5.	Cisteína	C	Cys	5.02	103.14
6.	Glutamina	Q	Gln	5.65	128.14
7.	Ácido glutámico	E	Glu	3.22	129.12
8.	Glicina	G	Gly	6.06	57.06
9.	Histidina	H	His	7.58	137.15
10.	Isoleucina	I	Ile	6.02	113.17
11.	Leucina	L	Leu	5.98	113.17
12.	Lisina	K	Lys	9.74	128.18
13.	Metionina	M	Met	5.75	131.21
14.	Fenilalanina	F	Phe	5.48	147.18
15.	Prolina	P	Pro	6.30	97.12
16.	Serina	S	Ser	5.68	87.08
17.	Treonina	T	Thr	6.53	101.11
18.	Triptófano	W	Trp	5.88	186.21
19.	Tirosina	Y	Tyr	5.65	163.18
20.	Valina	V	Val	5.97	99.14