



**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y
ACUICULTURA**

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PEPTÍDICOS BIOACTIVOS CON CAPACIDAD
QUELANTE DE HIERRO A PARTIR DE CASEÍNA HIDROLIZADA POR
BACTERIAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE RESIDUOS DE LANGOSTINO
(*Litopenaeus vannamei*)

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Alimentario

Autora:

Tixce Sulca, Sofia

Asesora:

Ayala Galdos, Maria Estela

(ORCID: 0000-0002-9455-5968)

Jurado:

Marín Machuca, Olegario

Aldave Palacios, Gladis Josefina

Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima - Perú

2023





Reporte de Análisis de Similitud

Archivo:	1A TIXCE SULCA, SOFIA Título Profesional de Ingeniera Alimentaria
Fecha del Análisis:	15 /04/2023
Operador del Programa Informático:	VARGAS MORENO MARTHA
Correo del Operador del Programa Informático:	mvargas@unfv.edu.pe
Porcentaje:	0 %
Asesor:	Dra. Ayala Galdos, María Estela
Título:	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PEPTÍDICOS BIOACTIVOS CON CAPACIDAD QUELANTE DE HIERRO A PARTIR DE CASEÍNA HIDROLIZADA POR BACTERIAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE RESIDUOS DE LANGOSTINO (<i>Litopenaeus</i>)
Enlace:	https://secure.arkund.com/old/view/156922297-518181-111686#q1bKLVayijbQMYzVUSrOTM/LTMtMTsxLTIWYMtAzMDA0MrA0Mza1tLAWNjA1sjQ1qQUA

Jefe de la Oficina de Grados y Gestión del Egresado:



Sello

Firma

Nombres y Apellidos

Ing. JOSÉ EDUARDO CANDELA DÍAZ



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PEPTÍDICOS
BIOACTIVOS CON CAPACIDAD QUELANTE DE
HIERRO A PARTIR DE CASEÍNA HIDROLIZADA
POR BACTERIAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE
RESIDUOS DE LANGOSTINO (*Litopenaeus
vannamei*)

Línea de Investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Alimentario

Autor(a)
Tixce Sulca, Sofia

Asesor(a)
Ayala Galdos, Maria Estela
(ORCID: 0000-0002-9455-5968)

Jurado
Marín Machuca, Olegario
Aldave Palacios, Gladis Josefina
Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima – Perú
2023

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo en primer lugar

A Dios, por ser mi guía y fortaleza, por recordarme siempre a no rendirme, ser valiente y perseverante para el cumplimiento de mis metas como el aquí presente. Gracias Dios mío por poner en mi camino a personas maravillosas que contribuyeron a la realización del presente trabajo. Mil gracias hasta la eternidad...

A mis Padres, porque gracias a ellos soy alguien en la vida.
Por sus consejos, sacrificios y dedicación. Los quiero mucho.

A mis hermanos, por sus consejos y por estar siempre ahí cuando más los necesité, gracias por alentarme a seguir adelante.

A mis primos y amistades por sus consejos y apoyo incondicional.
Muchas gracias...

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero y eterno agradecimiento:

A mis asesores externos de tesis, el **Dr. Víctor Miguel Albrecht Ruiz** y el **Ing. Carlos Pariona Velarde**, por depositar su confianza en mi, brindándome la oportunidad de participar en el proyecto que hizo posible la realización del presente trabajo, gracias por sus consejos, paciencia, dedicación y enseñanzas brindadas que aportaron en mi vida personal y profesional.

A mi asesora de tesis, la **Dra. Maria Estela Ayala Galdos**, por sus consejos, enseñanzas, tiempo y apoyo incondicional que aportaron en la realización de este trabajo.

A la **Blga. Yanina Salvatierra**, por su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

A mis compañeros tesistas del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), por sus consejos y enseñanzas compartidas.

A **FONDECYT** en el financiamiento de la presente tesis que fue parte del proyecto titulado “Obtención de péptidos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de caseína, empleando exoenzimas proteolíticas bacterianas de las especies *Bacillus subtilis* y *Shewanella putrefaciens* procedentes de residuos de langostinos” para el Convenio n°161-2017-FONDECYT-DIDITT-LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA (LB) que tuvo como entidad beneficiaria al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).

Agradezco a todas esas personas que, a través de sus consejos, motivación, apoyo incondicional, conocimientos y enseñanzas brindadas hicieron posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	<i>ii</i>
Agradecimiento	<i>iii</i>
Índice general	<i>iv</i>
Índice de tablas	<i>vii</i>
Índice de figuras	<i>ix</i>
Resumen (palabras clave).....	<i>x</i>
Abstract (key words)	<i>xi</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción y Formulación del Problema.....	1
1.2 Antecedentes.....	6
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	13
1.4 Justificación.....	13
1.5 Hipótesis.....	15
II. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Bases Teóricas Sobre el Tema de Investigación	16
2.1.1 Peptidos Bioactivos Alimentarios.....	16
2.1.1.1 Generalidades.....	16
2.1.1.2 Péptidos Bioactivos Obtenidos de Proteínas Lácteas.....	20

2.1.1.3	Actividad Biológica de Péptidos Bioactivos	22
2.1.1.3.1	Actividad Antidiabética	22
2.1.1.3.2	Actividad Antihipertensiva... ..	23
2.1.1.3.3	Actividad Anticancerígena.....	24
2.1.1.3.4	Actividad Antioxidante	25
2.1.1.3.5	Actividad Antimicrobiana.....	25
2.1.1.3.6	Actividad Quelante y Transportador de Minerales... ..	26
2.1.1.3.7	Actividad Multifuncional.....	27
2.1.2	Hierro en la Alimentación Humana	27
2.1.2.1	Importancia del Hierro en la Alimentación Humana.....	27
2.1.2.2	Biodisponibilidad y Antinutrientes de Hierro.....	28
2.1.2.2.1	Actividad Quelante del Hierro en Caseína.....	29
2.1.3	Proteínas	30
2.1.3.1	Proteínas Lácteas.....	31
2.1.3.2	Caseína	31
2.1.3.2.1	Clasificación de la Caseína	33
2.1.3.2.2	Hidrolizados de Caseína	35
2.1.3.2.3	Uso y Aplicaciones de Caseína en la Industria Alimentaria	39
2.1.4	Bacterias Proteolíticas en Crustáceos Marinos.....	39
2.1.4.1	Bacterias Obtenidas de Residuos de la Industria Langostinera	39
2.1.4.2	Bacterias Proteolíticas Obtenidas de:	40
2.1.4.2.1	Género Bacillus.....	40
2.1.4.2.2	Género Shewanella... ..	41
2.1.5	Enzimas Proteolíticas Bacterianas.....	43

2.1.5.1	Factores que Afectan la Velocidad de Reacción Enzimática...	44
2.1.5.2	Hidrólisis de Proteínas por Acción de Enzimas Bacterianas...	45
2.1.6	Técnicas de Análisis	46
2.1.6.1	Técnicas de Análisis en Proteína.....	46
2.1.6.1.1	Determinación de Proteínas Solubles por Método de Lowry.....	47
2.1.6.2	Técnicas de Análisis Enzimático	47
2.1.6.2.1	Actividad Enzimática.....	48
2.1.6.2.2	Grado de Hidrólisis de Proteínas	48
2.1.6.3	Técnicas de Análisis en Hierro.....	48
2.1.6.3.1	Determinación de la Actividad Quelante de Hierro.....	49
III.	MÉTODO	50
3.1	Tipo de Investigación.....	50
3.2	Ámbito Temporal y Espacial	50
3.3	Variables	50
3.4	Población y Muestra.....	51
3.5	Instrumentos.....	52
3.6	Procedimientos.....	59
3.7	Análisis de Datos... ..	71
IV.	RESULTADOS	72
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	99
VI.	CONCLUSIONES	102
VII.	RECOMENDACIONES	104
VIII.	REFERENCIAS	105
IX.	ANEXOS.....	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Productos alimentarios con péptidos bioactivos vendidos en el mercado..	3
Tabla 2: Péptidos encriptados con actividades biológicas de diferentes fuentes alimentarias.....	8
Tabla 3: Actividad hidrolítica microbiana marina de algunos microorganismos de origen marino.....	10
Tabla 4: Péptidos encriptados con actividad biológica obtenidos a partir de diferentes fuentes alimentarias.....	18
Tabla 5: Péptidos bioactivos obtenidos por diversos microorganismos y enzimas microbianas.....	20
Tabla 6: Enzimas aplicadas en la producción de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática.....	36
Tabla 7: Código de cepas bacterianas de residuos de langostino y el nombre de la especie perteneciente.....	60
Tabla 8: Puntos de medición para la curva estándar glicina.....	62
Tabla 9: Constituyentes del sistema de evaluación empleada.....	65
Tabla 10: Códigos de las muestras en evaluación (Muestra hidrolizada-A).....	65
Tabla 11: Constituyentes del sistema de evaluación empleada.....	66
Tabla 12: Códigos de las muestras en evaluación (precipitados con etanol-P).....	67
Tabla 13: Códigos de las muestras en evaluación (solubles en etanol-S).....	67
Tabla 14: Constituyentes para la curva estándar.....	69
Tabla 15: Códigos de las muestras en evaluación.....	69
Tabla 16: Constituyentes para la curva estándar.....	70
Tabla 17: Absorbancias para la curva Glicina.....	72
Tabla 18: Grado de hidrólisis (%GH) por acción proteolítica de las células bacterianas.....	73
Tabla 19: Absorbancias para la curva estándar.....	76
Tabla 20: Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras A.....	77

Tabla 21: Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras P.....	78
Tabla 22: Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras S.....	78
Tabla 23: Valores de Absorbancia para la Curva estándar de Tirosina.....	83
Tabla 24: Cantidad de proteína (ug/ul) en extractos solubles y precipitados de caseína hidrolizada.....	85
Tabla 25: Absorbancias para la curva EDTA.....	89
Tabla 26: Cantidad porcentual de Fe libre y quelado por efecto de extractos solubles y precipitados de caseína hidrolizada.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Línea de tiempo de las últimas dos décadas con respecto al número de artículos publicados en una base de datos.....	2
Figura 2: Estructura del enlace peptídico.....	32
Figura 3: Hidrólisis del enlace peptídico.....	36
Figura 4: Diagrama de flujo para la concentración de péptidos de caseína por hidrólisis enzimática de células bacterianas de residuos de langostino.....	61
Figura 5: Incremento de valores de absorbancia por concentración de Glicina.....	73
Figura 6: Grado de hidrólisis de la caseína por acción de las células bacterianas....	74
Figura 7: Incremento de valores de absorbancia por efecto de azocaseína hidrolizada.....	76
Figura 8: Actividad proteolítica en extractos peptídicos por acción bacteriana.....	79
Figura 9: Incremento de valores de absorbancia por cantidad de Tirosina en el sistema.....	84
Figura 10: Cantidad de proteína en extractos peptídicos por acción bacteriana.....	85
Figura 11: Disminución de valores de absorbancia por cantidad de EDTA (ug).....	90
Figura 12: Actividad quelante de extractos peptídicos obtenidos por acción bacteriana.....	92

Resumen

El presente trabajo tiene por objetivo obtener extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de hidrolizados de caseína por fermentación microbiana con bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino. La investigación fue experimental, con el apoyo de FONDECYT del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), cuyo Laboratorio de Biotecnología inoculó 4 cepas bacterianas marinas en el sustrato caseína para la fermentación en dos períodos de 24 y 48 horas. Los códigos de las muestras obtenidas y el nombre de la especie de procedencia fueron RL-15(08) *Shewanella putrefaciens group*, RL-15(19) *Shewanella sp.*, RL-15(41) *Shewanella sp.* y RL-15(42) *Bacillus velezensis*. Se realizó un proceso adicional de concentración de los extractos peptídicos empleando etanol, con que se obtuvo tres tipos de extractos: extractos iniciales (A), extractos solubles al etanol (S) y extractos precipitantes en etanol (P). Se realizaron las siguientes técnicas analíticas: Determinación del grado de hidrólisis, Determinación de la actividad proteolítica, Cuantificación de proteínas solubles y Determinación de la actividad quelante de hierro. Los resultados mostraron que, las cepas códigos RL-15 (19) y RL-15 (41) dieron respuestas máximas de actividad quelante de hierro de 84.21 % en los extractos peptídicos solubles al etanol (S) y de 84.03 % en los extractos peptídicos precipitantes en etanol respectivamente, generados por sus enzimas durante la fermentación de 48 horas y que superaron al patrón quelante EDTA. Se concluye que las bacterias proteolíticas del género *Shewanella sp.*, a través de sus enzimas generadas, son capaces de hidrolizar la caseína y producir péptidos bioactivos con actividad quelante de hierro que podrían ser aplicados en el desarrollo de alimentos funcionales. Por consiguiente, se recomienda realizar estudios de aplicación.

Palabras clave: Péptidos, bioactivos, hidrólisis, caseína, bacterias marinas, residuos de langostino, hierro, quelante.

Abstract

The objective of this work is to obtain bioactive peptide extracts with iron chelating capacity from casein hydrolysates by microbial fermentation with proteolytic bacterins isolated from shrimp residues. The research was experimental, with the support of FONDECYT of the Technological Institute of Production (ITP), whose Biotechnology Laboratory inoculated 4 marine bacterial strains in the casein substrate for fermentation in two periods of 24 and 48 hours. The codes of the samples obtained and the name of the species of origin were RL-15(08) *Shewanella putrefaciens group*, RL-15(19) *Shewanella sp.*, RL-15(41) *Shewanella sp.* and RL-15(42) *Bacillus velezensis*. An additional concentration process of the peptide extracts was carried out using ethanol, with which three types of extracts were obtained: initial extracts (A), ethanol-soluble extracts (S) and ethanol- precipitating extracts (P). The following analytical techniques were carried out: Determination of the degree of hydrolysis, Determination of the proteolytic activity, Quantification of soluble proteins and Determination of the iron chelating activity. The results showed that the code strains RL-15 (19) and RL-15 (41) gave maximum responses of iron chelating activity of 84.21% in the peptide extracts soluble in ethanol (S) and 84.03% in the peptide extracts. precipitants in ethanol respectively, generated by their enzymes during the 48-hour fermentation and that exceeded the EDTA chelating pattern. It is concluded that the proteolytic bacteria of the genus *Shewanella sp.*, through their generated enzymes, are capable of hydrolyzing casein and producing bioactive peptides with iron chelating activity that could be applied in the development of functional foods. Therefore, application studies are recommended.

Keywords: Peptides, bioactives, hydrolysis, casein, marine bacteria, shrimp residues, iron, chelator

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y Formulación del Problema

El ámbito de importancia de los alimentos no sólo se refiere a satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios para el organismo sino también para prevenir o tratar enfermedades (Food Insight, 2016; Gul et al., 2015; Urango et al., 2009; Mollet & Rowland, 2002) así como, mejorar la salud física y mental, inclusive en enfermedades crónicas (Butnariu y Sarac, 2019). A su vez, el bienestar a la salud que aportan, se conjuga con el surgimiento en avances tecnológicos (Betoret et al., 2011), estilos de vida (Arellano Cueva, 2017) y tendencias socioeconómicas, en este contexto surgen los *Alimentos Funcionales*.

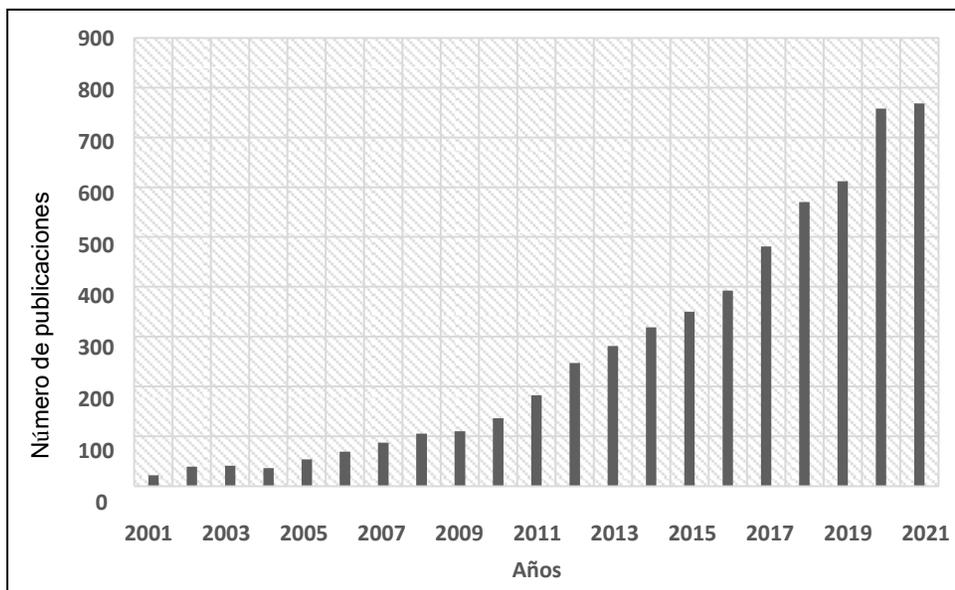
La funcionalidad de alimentos se refiere a los compuestos biológicamente activos que los conforman y los ubican en un mercado de desarrollo y crecimiento constante, aunque fluctuante por la estacionalidad, efectos climáticos, disponibilidad de recursos y agua. El término “bioactivo” fue introducido por Mellender e Isaksson en el año 1950 (Bueno Gavilá, 2017) en relación a su procedencia de diversas fuentes naturales. El ILSI Europe, International Life Sciences Institute in Europe (1999), declara un alimento como funcional cuando se demuestra exitosamente que aporta beneficios para la salud sobre una o varias funciones en el organismo más allá de los nutrientes básicos que puedan ofrecer. Dichos alimentos pueden ser naturales o aquellos que se les han agregado, quitado y/o variado uno o más de sus componentes, de aquí surge la tendencia por aprovechar materias primas alternativas que posean alguna característica bioactiva para generar alimentos e insumos funcionales.

En los últimos veinte años se aprecia un creciente interés por compuestos bioactivos, entre estos las proteínas, sumado a su valioso aporte nutricional aminoacídico y su diversa capacidad funcional tecnológica, como emulsificante, espumante y gelificante, entre otros

(Damodaran, 2010; Rembado y Sceni, 2009). Las proteínas hidrolizadas y péptidos derivados también constituyen una alternativa de beneficio a la salud humana (Abdel-Hamid et al., 2017; Du et al., 2016; Rizello et al., 2016; Orosco Condori, 2013; Clemente, 2000) y también pueden ser incluidas como ingrediente de alimentos funcionales o en aplicaciones en fármacos y nutracéuticos (Montesano et al., 2020). La figura 1 resalta la relación de estudios sobre péptidos bioactivos de fuentes proteicas enfocados a la salud, tanto de origen animal (leche, derivados de huevo, pescado, insectos, y otros) como de origen vegetal (soya, trigo, arroz, algas, entre otros), algunas aún por explorar (Montesano et al., 2020).

Figura 1

Línea de tiempo de las últimas dos décadas con respecto al número de artículos publicados en una base de datos ().*



(*) *Nota.* Es el resultado de la base de datos PubMed Medline al introducir en el buscador las palabras “*bioactive peptides in food*”.

La hidrólisis de proteínas lácteas es una práctica conocida para mejorar su digestibilidad

y aprovechamiento, generando además péptidos bioactivos como productos de interés biológico. La hidrólisis puede ser química, microbiana o enzimática, destacando los dos últimos tipos por no generar impacto negativo al ambiente ni daño oxidativo a los aminoácidos; la hidrólisis fermentativa, utilizando cultivos bacterianos o enzimas microbianas proteolíticas (Korhonen y Pihlanto, 2003) ha sido descrita para obtener sustancias quelantes y portadoras de minerales (Park y Nam, 2015). La hidrólisis enzimática es el método de mayor aplicación industrial actualmente por no provocar daño y permitir mejor control de proceso, lo que facilita su reproducibilidad y la obtención de péptidos bioactivos (Nasri, 2017). En la actualidad grandes mercados mundiales de Japón, EE.UU. y países europeos entre otros, son abastecidos con productos a base de hidrolizados proteicos (Tabla 1) que contienen péptidos bioactivos en sus formulaciones, obtenidos principalmente mediante blends enzimáticos comerciales; es importante señalar que esta tendencia no promueve la búsqueda de enzimas provenientes de fuentes naturales tales como los microorganismos.

Tabla 1

Productos alimentarios con péptidos bioactivos vendidos en el mercado

Nombre comercial	Nombre de producto	País de origen	Link de acceso
Ameal Peptide	Casein-derived peptides, Lactotripeptides : Valine-Proline-Proline and Isoleucine-Proline-Proline	Japón	https://www.amealpeptide.com/
Calpis (Calpico)	Leche agria Ameal	Japón	https://www.hlj.com/calpis-calpico-sour-milk-ameal-s-200ml-pet-cps17912

Gelita	Suplemento alimenticio a base de colágeno hidrolizado (péptidos bioactivos de colágeno)	Alemania	https://www.gelitaitienda.com/products/verisol-edicion-especial
Biozate 9	Proteína de suero hidrolizado	EEUU	https://www.agropur.com/us/ingredients/branded-ingredients/biozate-hydrolyzed-whey-protein
Osteum	Hidrolizado de proteína de leche rico en fosfopéptidos de caseína (CPP)	Francia	https://www.ingredientia.com/fields-of-expertise/bioactive-ingredients/dairy-based-bioactive-ingredients/
Lactium	Hidrolizado de proteína de leche que contiene un decapeptido llamado α -Casozeína	Francia	https://www.ingredientia.com/fields-of-expertise/bioactive-ingredients/dairy-based-bioactive-ingredients/

Entre los microorganismos, es importante destacar su capacidad de secretar muchas proteínas al medio extracelular tales como toxinas, adhesinas y gran variedad de enzimas hidrolíticas participantes del ciclo de vida bacteriano (Koster et al., 2000). Numerosos microorganismos son utilizados con fines industriales, por su facilidad de replicación y producción de enzimas de importancia industrial, así como su ventajosa estabilidad en rangos de pH y temperatura y la especificidad de su acción (Binod et al., 2013). Diversas industrias como la alimentaria, acuícola, farmacéutica, textil, fabricación de detergentes, papelera y otros, emplean enzimas bacterianas amilolíticas (Haki & Rakshit, 2003; Glazer, 1998; Wiseman, 1991), lipolíticas (Silver et al., 2007; Copa et al., 2006; Jaeger & Eggert, 2002; Undurraga et al.,

2001), proteolíticas (Neklyudov et al., 2000; Rao et al., 1998; Buchanan et al., 1997; Wong et al., 1996) y quitinolíticas (Howard et al., 2003; Podile & Prakash, 1996; Revah & Carroad, 1981).

Otra ventaja en el uso de microorganismos se refiere a su adaptación a bajas temperaturas y elevada concentración de sal (microorganismos psicrótrofos y halófilos) que son típicos de ambientes y actividades acuícolas según reportes (Mandragutti et al., 2021; León et al., 2016; Sánchez et al., 2004), a lo que se suma su tolerancia a presiones hidrostáticas altas, pH alcalinos, incluyendo condiciones de bajo o nulo contenido de oxígeno (medios anóxicos) (Bredholt et al., 2008; Feller y Gerday, 1996; Staley & Stanley, 1986). León et al. (2016) trabajando con Actinomicetos y bacterias marinas aisladas de conchas de abanico, demostraron la acción antimicrobiana frente a patógenos de importancia en acuicultura. Las enzimas bacterianas marinas pueden ser clasificadas como amilasas, pectinasas, quitinasas, lipasas, proteasas, y otros (Jha & Zi-rong, 2004; León et al., 2000; Staley & Stanley, 1986). Buleje Alfaro (2017) aisló, a partir de desechos de la industria langostinera, bacterias de importancia industrial y reducción en impacto ambiental. Las especies microbianas aisladas fueron *Acinetobacter iwoffii*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*.

También en el ámbito de las enzimas bacterianas extracelulares generadoras de compuestos bioactivos, Mellender e Isaksson (1950) referido por Bueno Gavilá (2017) obtuvieron efectos favorables sobre la biodisponibilidad y fijación de calcio en los huesos de niños raquíuticos. Ait-Oukhatar et al. (1999) y Ait-Oukhatar et al. (2002) administraron caseinofosfopéptidos unidos a hierro en ratas observando la mejora en su biodisponibilidad, reflejada en el aumento de sus niveles de hemoglobina y almacenamiento de hierro en sus

tejidos; estudios complementarios indican que el hierro unido a los caseinofosfopéptidos también evita su captura e inhibición por otros minerales tales como el calcio y zinc (Ait- Oukhatar et al., 2002; Pérès et al., 1999; Pérès et al., 1997).

Lo anterior despierta el interés por la actividad promotora de los péptidos bioactivos para absorción de minerales. Al respecto, el hierro es relevante por su intervención en actividades del metabolismo celular, su carencia ocasiona anemia, una de las carencias alimentarias más importantes en el mundo (OMS, 2020). La anemia no sólo obedece al bajo consumo de hierro (dietas vegetarianas) o a la absorción digestiva deficiente (en celíacos), también se produce por la insuficiente ingesta en situaciones de enfermedad, o en grupos de riesgo, especialmente niños y mujeres embarazadas, o por pérdidas de sangre durante el sangrado menstrual (Cardero et al., 2009). Tampoco la ingesta total de hierro asegura su completa absorción, interactúan factores químicos (hierro hemo o no hemo), factores dietéticos (alimentos anti nutrientes), tanto como las reservas de hierro en el organismo (Hunt & Roughead, 2000).

En base a lo expuesto, el presente trabajo plantea la obtención de extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de caseína hidrolizada por bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*).

1.2. Antecedentes

El termino *Alimentos funcionales* fue empleado en Japón a inicios de los años 80. En el año 1991, dicho país crea una legislación específica que permite comercializar y etiquetar aquellos “alimentos para uso específico en la salud” (Foods for Specific Health Use, FOSHU), una vez sean aprobados por el Ministerio de salud si se demuestra científicamente la capacidad funcional que se afirma. En el año 1993, EEUU permite la denominación de ciertos alimentos

como “aquellos que reducen el riesgo de padecer enfermedades”; de igual manera, la obtención del alegado que se otorga debe ser autorizada por la Administración para Alimentos y Medicamentos (FDA, siglas en inglés) tras su comprobación científica de la capacidad que posea (Leal et al., 2016). Los compuestos bioactivos forman parte de los alimentos funcionales, ya que pueden estar incluidos de forma natural o ser adicionados durante su proceso. Las proteínas poseen importancia funcional y estructural en el organismo (Daliri et al., 2017), sus fragmentos peptídicos (bioactivos) encriptados pueden cumplir actividades biológicas favorables a la salud humana una vez liberados de su proteína precursora (Kitts y Weiler, 2003), lo cual es facilitado por la digestión gastrointestinal (Vioque y Millán, 2006) produciendo sustancias antimicrobianas, antihipertensivas, antioxidantes, anticitotóxicas, inmunomoduladoras, opioides y portadoras de minerales (Park y Nam, 2015). El primer péptido bioactivo fue reportado por Mellander en el año 1950, quien afirmaba que algunos péptidos derivados de la caseína podían ser capaces de combatir la enfermedad de Raquitismo en bebés mejorando la calcificación de sus huesos. La tabla 2 muestra diversos estudios que demuestran la obtención de péptidos bioactivos provenientes de proteínas de diferentes alimentos.

Los péptidos bioactivos se obtienen a través de la hidrólisis de proteínas. El proceso de hidrólisis puede ser de dos tipos: químico (ácidos o bases) y biológico (microorganismos y enzimas). La hidrólisis es una práctica antigua aplicada para mejorar la digestibilidad, palatabilidad y conservación de las proteínas que hasta la fecha se sigue realizando. La hidrólisis enzimática es la de mayor aplicación en la actualidad debido a la practicidad de su proceso, bajos costos, no genera efectos secundarios, entre otros (Gallegos Tintoré, 2012). Los primeros indicios del empleo de enzimas se dieron con Luis Pasteur durante el siglo XIX, al realizar el proceso de fermentación alcohólica del azúcar por levaduras.

Tabla 2*Péptidos encriptados con actividades biológicas de diferentes fuentes alimentarias*

Alimento	Proteína precursora	Actividad del péptido	Enzima	Tipo de estudio	Referencias
Leche de vaca, cabra, oveja y búfala	Caseínas seroproteínas	Estimulantes Inhibidores de Renina Inhibidores de DPP4 Antioxidantes Inhibidores de ACE Inhibidores de DPP3 Hipo colesterolémicos Reguladores Anticancerígenos Inmunomoduladores Inhibidores de CaMPDE	Pepsina Tripsina Quimotripsina	In vitro	Barrero et al., 2021
Salvado de avena	Proteínas del salvado de avena	Quelante de minerales Antioxidantes	Protamex	In vitro	Baakdah y Tsopmo, 2016
Soja	Proteína de soja	Quelante de calcio (Ca)	Neotrasa Flavourzyme Proteasa M Pepsina	In vitro	Bao et al., 2008
Amaranto	Proteínas de amaranto	Actividad antitrombótica	Pepsina Pancreatina	In vitro	Sabbione et al., 2014
Leche de oveja	Caseinatos	Antioxidante Antihipertensiva Antimicrobiana	Proteasas microbianas (<i>Bacillus sp.</i>)	In vitro	Corréa et al., 2011

Trigo	Gluten de trigo	Antioxidante Inhibidores de ECA	Alcalasa Acidasa	In vitro	Dragoet al., 2013
Yemade huevo	Fosvitina	Quelante de calcio (Ca)	Tripsina	In vitro In vivo	Zhong et al., 2016
Semilla de tarwi	Proteína del tarwi	Antioxidante	Alcalasa Proteasas microbianas <i>(Bacillus sp.)</i>	In vitro	Borja Lozano, 2014
Cañihua	Proteínas harina de cañihua	Antioxidante Antihipertensiva	Neutrasa Alcalasa	In vitro	Ochoa Pachas,2 018
Garbanzo	Proteínas de harina de garbanzo	Quelante de cobre (Cu) Quelante de hierro (Fe+2)	Alcalasa Flavourzi me Pepsina Pancreatina	In vitro	Megías et al., 2007
Leche de búfala	α S- caseína	Quelante de hierro (Fe+2)	Corolasa pp Alcalasa Flavourzime	In vitro	Torres- Fuentes etal., 2012 Jaiswal et al., 2014
Leche	Proteínas dela leche (caseínas y proteínas del suero	Quelante de hierro y calcio	Enzimas microbianas	In vitro	Figuroa Hernánde z et al., 2012

En el año 1897, Eduard Buchner, logró extraer las enzimas de las levaduras y realizó el primer proceso fermentativo sólo con ellas. A partir de ahí, muchas enzimas fueron aisladas de diversas fuentes naturales como animal, vegetal y microbiana, quienes son empleados en el

proceso de alimentos y fármacos (Primo Yufera, 2007). Las enzimas proteolíticas se han empleado desde la antigüedad en innumerables procesos biotecnológicos como elaboración de cerveza, quesos, textura cárnica y panificación (Whitehurst y Law, 2002); y que en la actualidad son los más empleados para diferentes procesos industriales.

Existe una gama de blends enzimáticos comerciales de origen animal (quimotripsina), vegetal (papaína) y microbiana. Estos últimos resultan ventajosas económicamente por su facilidad de replicación, a esto se suma que las enzimas bacterianas presentan estabilidad en rangos de pH y temperatura, así como especificidad de acción (Binod et al., 2013). Las bacterias se hallan en diferentes fuentes naturales, y pueden ser aislados y almacenados para su uso a futuro (Buleje Alfaro, 2017). Este hecho despierta el interés por hallar nuevos medios para obtener enzimas de importancia industrial. El incremento de estudios de microorganismos de medios marinos sugiere su capacidad de generar compuestos biológicamente activos y propiedades versátiles (Mandragutti et al., 2021), lo cual abre paso a su aprovechamiento como fuentes interesantes por explotar (Bredholt et al., 2008). En la tabla 3 se aprecian algunos hallazgos de enzimas microbianas y sus fuentes de obtención.

Tabla 3

Actividad hidrolítica microbiana marina de algunos microorganismos de origen marino.

Fuente de obtención	Microorganismo	Actividad hidrolítica	Autor, año
Lagos de soda hipersalinos	<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa alcalina extracelular	Ibrahim et al. (2015)
Desechos de langostinos	<i>Bacillus, Burkholderia, Ochrobactrum, Vibrio, Pseudomonas y Shewanella</i>	Proteasas, amilasas, lipasas y quitinasas	Sirvas et al. (2021)

Agua de mar contaminada con efluentes pesqueros	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i>	Proteasas extracelulares	Sánchez et al. (2004)
Invertebrados intersticiales y bentónicos	<i>Vibrio</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Moraxella</i> y otros géneros no identificadas	Enzimas extracelulares (caseinasa, esterasa, amilasa, gelatinasa, ADNasa, agarasa, lecitinasa)	León et al. (2000)
Isla Rey Jorge de la península Fildes, Antártica	<i>Pseudomonas sp.</i>	Proteasas extracelulares	Fullana (2014)
Intestino de <i>Grania sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> y otras cepas microbianas	Celulasas, proteasas, agarasas y amilasas	Herrera (2015)
<i>Argopecten purpuratus</i> (concha de abanico)	<i>Streptomyces</i>	Enzimas extracelulares (proteasas y lipasas)	León et al. (2016)
Ambientes marinos contaminados	<i>Pseudomonas</i>	Enzimas psicrotóficas halotolerantes (proteasas)	Arauco et al. (2004)

Una de las características funcionales de los hidrolizados proteicos y péptidos derivados es su capacidad de unión a minerales (Figuerola-Hernández et al., 2012; Koch y Vasek, 2014; Torres-Fuentes et al., 2012). Los estudios con respecto a la capacidad quelante de proteínas y péptidos hidrolizados para unirse a minerales como el hierro, han demostrado mejoras en su aprovechamiento por el organismo (Guo et al., 2014) y su conveniencia para mejorar la nutrición humana (Walters et al., 2018). Este interés de estudio es motivado en buscar alternativas de solución ante el problema de salud mundial que se sigue percibiendo en estos tiempos como el hierro y su carencia. Este mineral cumple funciones importantes en la respiración celular, síntesis

de ADN/ARN y expresión genética y su carencia causa trastorno nutricional, emocional y físico (Lozoff et al., 2006; Umbreit, 2005), provocando la anemia. Al respecto han surgido propuestas de mejora, Donato (2017) estudió las causas de deficiencia de hierro en Argentina, y estableció acciones preventivas, diagnóstico clínico, y tratamiento de la enfermedad. Selva y Ochoa (2011) plantearon 3 proyectos para afrontar la deficiencia de hierro en Cuba, incluyendo capacitaciones a personas involucradas en temas de alimentación saludable y nutrición, así como entregas de alimento fortificado con hierro y micronutrientes en polvo. Duran et al. (2017) realizaron una recopilación de información respecto a las ventajas de la tecnología de encapsulamiento como herramienta de prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. Por su parte, han surgido estudios con péptidos bioactivos en la búsqueda de actividades quelantes de minerales para mejorar el aprovechamiento del hierro en el organismo. Por ejemplo, Vargas Ramírez (2018) evaluó la capacidad quelante y antioxidante de hidrolizados proteicos provenientes de pastas residuales de la extracción de aceites de *Jatropha curcas L.*, oleaginosa mexicana.

En adición, las proteínas alimentarias con respecto a sus péptidos encriptados y la actividad proteolítica de enzimas microbianas podrían aprovecharse para el surgimiento de nuevos productos que contribuyan a la salud como mejorar la absorción de hierro. Por ejemplo, Figueroa-Hernández et al. (2012) obtuvieron péptidos bioactivos con capacidad quelante de calcio y hierro por fermentación microbiana de la caseína utilizando *Lactococcus lactis*.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Obtener extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de hidrolizados de caseína utilizando bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino.

1.3.2. Objetivos Específicos

Evaluar el grado de hidrólisis de caseína utilizando bacterias proteolíticas del género *Bacillus*

Evaluar el grado de hidrólisis de caseína utilizando bacterias proteolíticas del género *Shewanella*

Separar las fracciones hidrolizadas de caseína obtenidas por la utilización de bacterias proteolíticas de los géneros *Bacillus* y *Shewanella*

Evaluar la actividad quelante de hierro en hidrolizados de caseína obtenidos por actividad de bacterias proteolíticas del género *Bacillus*

Evaluar la actividad quelante de hierro en hidrolizados de caseína obtenidos por actividad de bacterias proteolíticas del género *Shewanella*

1.4. Justificación

La anemia es un grave problema de salud pública en el mundo que afecta particularmente el 42 % de niños menores de 5 años y 40 % de las embarazadas, debido principalmente a carencias nutricionales del mineral (folato, vitaminas B12 y A), hemoglobinopatías; enfermedades infecciosas como el paludismo, tuberculosis, sida y parasitosis (OMS, 2020). Esta realidad abre paso a la búsqueda de alternativas de solución que puede surgir a través de las proteínas lácteas y sus péptidos bioactivos en el desarrollo de alimentos funcionales ya que son fuentes con múltiples funcionalidades reportadas (Pes, 2022; Nongonierma y FitzGerald, 2016). La importancia de las proteínas lácteas empleadas como ingredientes de alimentos se basa en sus actividades biológicas, aportando beneficios para la salud (Barrero et al., 2021; Baro et al., 2001) como la mejora de absorción de minerales a través de la capacidad quelante que puedan poseer.

Walters et al. (2018); Eckert et al. (2014); Baakdah y Tsopmo (2016) afirmaron que las proteínas y péptidos son capaces de quelar y transportar minerales debido a los residuos de aminoácidos conformados, facilitando la absorción de minerales como el hierro, necesarios en la nutrición humana.

El problema de salud por carencia del hierro también es posible por exceso del mineral debido a que los iones ferrosos (Fe^{+2}) pueden formar radicales libres al unirse con el peróxido de hidrógeno; provocando peroxidación de lípidos, causante de muerte celular (ferroptosis) en el organismo, y que en los alimentos ocasiona modificaciones de sabor, valor nutricional y vida útil. Precisamente el uso de antioxidantes (vitamina E y su derivado-tórox) cumplen funciones quelantes del hierro; al respecto, quelantes peptídicos de proteínas alimentarias y funciones antioxidantes, se presentan como una buena alternativa. (Walters et al., 2018).

La obtención de péptidos bioactivos a partir de enzimas microbianas ha sido aplicada también a partir de residuos y/o desechos industriales con fines de mitigación del impacto ambiental, (Buleje Alfaro, 2017; Saval Bohórquez, 2012). El empleo de microorganismos como agentes productores de enzimas es ampliamente conocido y utilizado con fines de interés industrial y comercial (Buleje Alfaro, 2017; Saval Bohórquez, 2012; Ostos et al., 2018; Borja Lozano, 2014; Luevano- Escareño, 2014). Aquí es importante resaltar que también los microorganismos de medios marinos son capaces de generar compuestos biológicamente activos (Mandragutti et al., 2021) demostrando así ser fuentes interesantes por explotar (Bredholt et al., 2008).

Entre los microorganismos marinos productores de enzimas proteolíticas, se conoce los *Bacillus* (Lentini et al., 2007; Ibrahim et al., 2015; Rodas et al., 2009) y bacterias del género *Shewanella* (Pucci et al., 2009; Ivanova et al., 2004; Atienzar Fernández, 2019). La especie

Shewanella putrefaciens ha sido descrita además como “bacteria gram negativa marina, anaeróbia facultativa, capaz de reducir hierro y manganeso, usándolos como aceptores finales de electrones de la cadena respiratoria (Sharma y Kundu, 2010).

Por todo lo expuesto, el presente trabajo tiene el objetivo de obtener extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro de hidrolizados de caseína empleando bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino.

1.5. Hipótesis

Ho: Se obtienen extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de hidrolizados de caseína utilizando bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino.

Ha: No se obtienen extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de hidrolizados de caseína utilizando bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas Sobre el Tema de Investigación

2.1.1. *Péptidos Bioactivos Alimentarios*

2.1.1.1.Generalidades. Los péptidos bioactivos alimentarios son pequeños segmentos contenidos en una proteína dietética, conformada por lo general entre 2 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos o también llamados enlaces amida. El efecto biológico que poseen propicia favorablemente la mejora de nuestras condiciones de salud; sin embargo, para que esto suceda, requieren ser liberadas de la proteína nativa o intacta (Vizcardo y Zavala, 2016; Yang et al., 2021). Críptidos, criptinas y criptomias son términos derivados de las ciencias ómicas para referirse a los péptidos encriptados, proteínas y campo de estudio respectivamente (Pes, 2022); sin embargo, es importante referir que la bioactividad de los críptidos hidrolizados de las criptinas puede o no ser similar a la de su precursor proteico, lo cual podría guardar relación con las fuentes de origen de los críptidos derivadas tanto de fuentes alimentarias como no alimentarias (Iavarone et al., 2018) (Ueki et al., 2007; Mukai et al., 2008; Mora y Hayes, 2015).

La hidrólisis proteica es obtenida a través de la digestión propia del organismo o por algún tratamiento previo (Vioque y Millan, 2006), empleando enzimas aisladas de fuentes animales, vegetales y microbianas, o por efecto de procesos de fermentación empleando cepas bacterianas o fúngicas (Benitez et al., 2008; Ostos et al., 2018; Korhonen y Pihlanto, 2003). La hidrólisis química ácida o básica es poco aplicada industrialmente por la dificultad de su control y efectos secundarios perjudiciales al ambiente y propiedades funcionales de las proteínas y péptidos derivados (Navarro et al., 1972; Guadix et al., 2000; Kristinsson y Rasco, 2000).

Las actividades biológicas de péptidos bioactivos alimentarios de origen animal y vegetal son diversas (Kitts y Weiler, 2003; Daliri et al., 2017; Korhonen y Pihlanto, 2003; Vizcardo y

Zavala, 2016; Montesano et al., 2020), entre ellas resaltan las antihipertensivas, antimicrobianas, opiáceas, inmunomoduladores, antioxidantes, quelantes y transportadores de minerales, anticancerígenas, antitrombóticas, entre otros (Hartmann y Meisel, 2007; Sharma et al., 2011; Daliri et al., 2017; Vizcardo y Zavala, 2016), además de péptidos con actividad multifuncional (Oliva y Vega, 2004; Corréa et al., 2011, Pes, 2022). La tabla 4 recopila algunos péptidos bioactivos, también existe la base de datos conocido BIOPEP-UMW, brinda información detallada de una diversidad de péptidos bioactivos de fuentes dietéticas, no dietéticas, endógenas y no endógenas. La bioactividad de los péptidos está relacionada con el número, tipo, secuencia y conformación espacial de aminoácidos en su estructura, así como su fuente de origen y el contacto con otros componentes para la elaboración de un alimento funcional. (Yang et al., 2021).

Uno de los primeros pasos para el estudio de los péptidos bioactivos, inicia en estudios *in vitro*, estudios *in silico* (métodos bioinformáticos) y su validación a través de estudios *in vivo* (animales o humanos) (Fitz et al., 2019 citados por Barrero et al., 2021). Kitts y Weiler, 2003 refieren la importancia de estudios sobre la descripción de la capacidad fisiológica de péptidos bioactivos procedentes de fuentes proteómicas alimentarias. La distribución al sistema biológico y expresión de la bioactividad de los péptidos bioactivos depende de si llegan intactos al intestino delgado y/o pueden atravesar la barrera intestinal celular y llegar al torrente sanguíneo, requieren por tanto resistir las condiciones de la barrera enzimática y flora microbiana gastrointestinal (Shimizu y Son, 2007; Miner-Williams et al., 2014).

Tabla 4

Péptidos encriptados con actividades biológicas obtenidos a partir de diferentes fuentes alimentarias.

ALIMENTO	PROTEÍNA PRECURSOR A	ACTIVIDAD DEL PÉPTIDO	ENZIMA	TIPO DE ESTUDI O	REFERENCIAS
Leche de vaca, cabra, oveja y búfala	Caseínas seroproteínas	Estimulantes Inhibidores de Renina Inhibidores de DPP4 Antioxidantes Inhibidores de ACE Inhibidores de DPP3 Hipocolesterolémicos Reguladores Anticancerígenos Inmunomoduladores Inhibidores de CaMPDE	Pepsina Tripsina quimotripsina	In sílico	Barrero et al., 2021
Salvado de avena	Proteínas del salvado de avena	Quelante de minerales Antioxidantes	Protamex	In vitro	Baakdah y Tsopmo, 2016
Soja	Proteína desoja	Quelante de calcio (Ca)	Neotrasa Flavourzyme Proteasa M Pepsina	In vitro	Bao et al., 2008
Amaranto	Proteínas de amaranto	Actividad antitrombótica	Pepsina Pancreatina	In vitro	Sabbione et al., 2014

Leche de oveja	Caseinatos	Antioxidante Antihipertensiva Antimicrobiana	Proteasas microbianas (<i>Bacillus sp.</i>)	In vitro	Corréa et al.,2011
Trigo	Gluten de trigo	Antioxidante Inhibidores de ECA	Alcalasa Acidasa	In vitro	Drago et al.,2013
Yema de huevo	Fosvitina	Quelante de calcio (Ca)	Tripsina	In vitro In vivo	Zhong et al.,2016
Semillas de tarwi	Proteínas del tarwi	Antioxidante	-Alcalasa -Proteasas microbianas (<i>Bacillus sp.</i>)	In vitro	Borja Lozano, 2014
Cañihua	Proteínas harina de cañihua	Antioxidante Antihipertensiva	-Neutrasa -Alcalasa	In vitro	Ochoa Pachas, 2018
Garbanzo	Proteínas de harina de garbanzo	Quelante de cobre (Cu) Quelante de hierro (Fe +2)	-Alcalasa -Flavourzime -pepsina -pancreatina	In vitro	Megías et al., 2007 Torres-Fuentes et al., 2012
Leche de búfala	α S-caseína	Quelante de hierro (Fe+2)	-Corolasa PP -Alcalasa -Flavourzime	In vitro	Jaiswal et al., 2015
Leche	Proteínas de la leche (caseínas y proteínas del suero)	Quelante de hierro y calcio	Enzimas microbianas (<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris NCFB 7</i>)	In vitro	Figuerola-Hernández et al., 2012

2.1.1.2. Péptidos Bioactivos Obtenidos de Proteínas Lácteas. Secuencias peptídicas específicas de origen lácteo han demostrado presentar propiedades funcionales de interés gracias a su versatilidad fisiológica y fisicoquímica, este tipo de péptidos pueden formar parte de alimentos funcionales con fines saludables (Korhonen & Pihlanto, 2003). En la tabla 5, se muestra la obtención de péptidos bioactivos de la leche y de proteínas lácteas, empleando microorganismos y enzimas microbianas.

Tabla 5

Péptidos bioactivos obtenidos por diversos microorganismos y enzimas microbianas

SUSTRATO	MICROORGANISMOS UTILIZADOS	PROTEÍNA PRECURSORA	SECUENCIA DE PÉPTIDOS	BIOACTIVIDAD	REFERENCIA
Leche	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B-caseína, K-caseína	Val-Pro-Pro,Ile-Pro-Pro	Inhibición de la ECA Anti hipertensivo	Takano & van Leeuwenhoek(2002) Nakamura, Yamamoto, Sakai, Okubo, et al. (1995) Nakamura, Yamamoto, Sakai, Takano, et al. (1995)
Leche	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK 16H	B-caseína, K-caseína	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Atenúa el desarrollo de hipertensión en SHR	Hata, et al. (1996)

Leche	<i>Lactobacillus helveticus</i> ,	X	X	Inmunoestimulante	Matar, et al. (1996)
Leche	<i>Lactobacillus GG</i> Enzimas+ pepsina y Tripsina	B-caseína αs1-caseína	Tyr-Pro- Phe-Pro Ala-Val- Pro-Tyr- Pro-Gln- Arg Thr-Thr- Met-Pro- Leu-Trp	Opioide Inhibidor de la ECA Inmunoestimulador	Rokka, et al. (1997)
Leche	<i>Lactobacillus helveticus</i> CPN 4	Proteínas de suero	Tyr-Pro	Inhibidor de la ECA	Yamamoto, et al. (1999)
Leche	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> SS1 <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> FT4	B- caseína, K- caseína	Muchos fragmentos	Inhibidor de la ECA	Gobbetti, et al. (2000)
Leche	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> IFO13953	K-caseína	Ala-Arg- His-Pro- His-Pro- His-Leu- Ser-Phe- Met	Antioxidante	Kudoh, et al. (2001)
Suero	<i>Kluyveromyces marxianus var. Marxianus</i>	B- Lactoglobulina	Tyr-Leu- Leu-Phe	Inhibidor de la ECA	Belem, et al. (1999)
Suero	<i>Tritirachium album</i> Proteinasa K derivada	B- Lactoglobulina A	Ile-Pro- Ala	Antihipertensivo	Abubakar, et al. (1998)

Caseína	<i>Lactobacillus helveticus</i> Proteinasa CP90	B-caseína	Lys-Val- Leu-Pro- Val-Pro- (Glu)	Inhibidor de la ECA	Maeno, et al. (1996)
Fracciones de Caseína	<i>Lactobacillus GG</i>	α 1- caseína, B- caseína, K-caseína	X	Inmunomodulador	Sütas, et al. (1996)

X: proteína precursora o péptidos activos no identificados

Nota. Datos tomados del artículo científico de Korhonen & Pihlanto (2003).

2.1.1.3. Actividad Biológica de Péptidos Bioactivos. Las investigaciones sobre estos componentes bioactivos son de gran atención por su importancia en la salud humana. Existen numerosos estudios sobre péptidos derivados de caseínas, de proteínas séricas con propiedades biológicas interesantes como actividades opioides (Teschemacher, 2003), antihipertensivos (Correa et al., 2011), antimicrobianos (López-Expósito y Recio, 2008; Rocha et al., 2013), antitrombóticos (Rojas-Ronquillo et al., 2012), inmunomoduladores (Huang et al., 2010), quelantes-transportadores de minerales (Sharma et al., 2011; Figueroa-Hernández et al., 2012) entre otros. A continuación, se presenta algunas de las más importantes actividades sobre las cuales los péptidos bioactivos influyen favorablemente.

2.1.1.3.1. Actividad Antidiabética. La diabetes sacarina, mellitus o simplemente diabetes (DM2), es un trastorno metabólico que afecta al 10 % de la población mundial entre los 20 y 79 años (Federación Internacional de la Diabetes, 2021) y se estima que llegará a 46% para el 2045 (Mena Roa, 2021). La DM2 es ocasionada por elevados límites de glucosa en la sangre por la disfunción de hormonas peptídicas gastrointestinales (incretinas) reguladoras de insulina (Daliri et al., 2017). Nauck (2011) ha referido que la enzima dipeptidil peptidasa-4 - DPPIV

hidroliza estas hormonas afectando su función.

Numerosos estudios han enfocado la inhibición de esta enzima que representa una alternativa de posible tratamiento de DM2 proponiendo DPPIV sintética; sin embargo, se conoce que estos productos químicos pueden generar ciertos efectos adversos en la salud (Richard et al., 2011; Langley et al., 2007; Stulc y Sedo, 2010). Al respecto, los péptidos de proteínas alimentarias resultan una posible solución, así lo han demostrado los estudios de inhibidores de DPPIV realizados por Takahashi et al. (2021) utilizando péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática del lecho de salmón, un subproducto pesquero. También Vilcacundo et al. (2017) evaluaron la actividad antidiabética inhibidora de la DPPIV, α -amilasa y α -glucosidasa mediante ensayos in vitro en péptidos de proteínas de quinua obtenidos por hidrólisis gastrointestinal simulada con pepsina y pancreatina. Nongonierma y FitzGerald (2015) estudiaron la capacidad inhibidora de la DPPIV en péptidos de proteínas de cáñamo, guisante, arroz y soja a través de ensayos in vitro con tres enzimas comerciales y digestión gastrointestinal simulado. Harnedy et al. (2015) estudiaron las proteínas de la microalga *Palmaria palmata* en relación a la capacidad inhibidora de la DPPIV en sus péptidos derivados a través de ensayos in vitro con enzimas Corolasa PP. Zhang et al. (2015) estudiaron la capacidad inhibidora de la DPPIV en péptidos de leche de cabra a través de ensayos in vitro con enzimas tripsina y quimotripsina.

2.1.1.3.2. Actividad Antihipertensiva. La hipertensión es una de las principales enfermedades de gravedad extrema que afecta negativamente al sistema cardiovascular, cerebral y urinario (OMS, 2021); además de presentar alguna asociación con el SARS-CoV-2, virus del COVID-19 (García-Castro et al., 2022). La hipertensión es producto de la acción de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) a angiotensina II, péptido de función vasoconstrictora, en adición, la ECA contribuye a la degradación de la bradicinina, un dilatador de la presión arterial.

Los tratamientos incluyen sustancias sintéticas (García- Castro et al., 2022) que lamentablemente provoca efectos secundarios en el organismo del paciente (Gebreyohannes et al., 2019), esto conduce a reemplazar estas drogas por fuentes naturales como los péptidos bioactivos de actividad antihipertensiva obtenidos de proteínas alimentarias.

2.1.1.3.3. Actividad Anticancerígena. El cáncer es un término genérico para referirse a un conjunto de enfermedades que se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo, debido a la multiplicación rápida de células anormales que invaden partes adyacentes del cuerpo y logran prolongarse a otros órganos del mismo (OMS, 2022). Es la principal causa de muerte a nivel mundial; cerca de 10 millones de defunciones fueron reportadas en el año 2020 (OMS, 2022). Las intervenciones quirúrgicas, radioterapias y quimioterapias son algunos de los tratamientos empleados contra el cáncer, aunado al empleo de fármacos sintéticos, lo cual ha logrado en lo posible paliar esta situación; sin embargo, el uso de estos medicamentos trae consigo efectos secundarios adversos e incluso la resistencia de células cancerosas a estos fármacos terapéuticos (Chiangjong et al., 2020).

Péptidos de fuentes naturales han sido reportados con capacidad anticancerígena, así como la modificación estructural de éstos con fines de incremento en citotoxicidad, especificidad y mayor eficacia de la terapia (Chiangjong et al., 2020). Se han reportado péptidos bioactivos anticancerígenos a partir de fuentes naturales como la soya (González- Montoya et al., 2018), hongos comestibles (Prateep et al., 2017), colágeno de organismos marinos (Ramirez-Guerra et al., 2013), amaranto (Maldonado-Cervantes et al., 2010), leche (Pepe et al., 2013); además se reportan péptidos antimicrobianos con capacidad anticancerígena (Felício et al., 2017). La capacidad de estos péptidos bioactivos se manifiesta a través de diferentes mecanismos de acción, como la afinidad interactiva electrostática con la membrana celular mitocondrial o

cancerosa, conduciendo a la apoptosis (Xie et al., 2020).

2.1.1.3.4. Actividad Antioxidante. Como resultado de las reacciones metabólicas en los organismos vivos se forman las especies reactivas de oxígeno (ROS). Su formación excesiva puede dañar a las proteínas (enzimas), lípidos (membrana celular) y ADN (material genético), producto de la incapacidad antioxidante fisiológica ante la excesiva cantidad de radicales libres, manifestándose a través de la formación de ciertos tipos de enfermedades (cáncer, cardiaco, artritis reumatoide, etc.) y el envejecimiento. De manera análoga, dicho efecto oxidativo también se puede manifestar en los alimentos a través de la peroxidación lipídica (rancidez), sabores anormales y reducción de la vida útil en los productos. Se han creado antioxidantes sintéticos para paliar dicha situación; sin embargo, el empleo de éstos se reduce por los efectos secundarios que generan en el organismo.

La búsqueda de antioxidantes naturales (compuestos fenólicos) se ha desarrollado para reemplazar a los sintéticos; sin embargo, poseen baja capacidad antioxidante e insolubilidad en sistemas acuosos. El estudio de péptidos antioxidantes ha manifestado su actividad a través de la captación de radicales libres y la quelación con iones metálicos que catalizan las reacciones oxidativas (Ruiz et al., 2013). Se reportan fuentes alimentarias que encriptan péptidos antioxidantes en sus proteínas: amaranto (Delgado et al., 2016), frijol común (Mendoza-Jiménez et al., 2018), quinua (Cisneros Yupanqui, 2017), tarwi (Borja Lozano, 2014), chía (Galazzi et al., 2018), garbanzo (Ambriz et al., s.f.), suero bovino (Hernandez-Ledesma et al., 2005), leche (Saracho Álvarez, 2011).

2.1.1.3.5. Actividad Antimicrobiana. Uno de los problemas que se ha convertido en un reto para las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias ha sido combatir la contaminación microbiana (Ebrahimabadi et al., 2010). En efecto, se crearon antibióticos, pero

sus usos excesivos e incontrolados han generado resistencia de patógenos a dichas sustancias químicas (Nasri, 2017). El descubrimiento de péptidos antimicrobianos naturales o derivados de fuentes alimentarias se han convertido en interesantes alternativas de reemplazo de las sustancias químicas convencionales (Nasri, 2017).

Los péptidos bioactivos actúan insertándose en los microorganismos a través de su pared celular aniónica y membrana de fosfolípidos, provocándoles la muerte bacteriana (Nasri, 2017). La actividad que poseen está en función a su secuencia aminoacídica y estructura tridimensional (Nasri, 2017). Diferentes fuentes alimentarias han demostrado poseer péptidos con capacidad antimicrobiana, siendo algunas de ellas reportadas: la hemoglobina bovina (Yabe Adje et al., 2011), lisozima de clara de huevo de gallina (Pellegrini et al., 1997), proteína del suero (Demerse-Mathieu et al., 2013), subproductos de cangrejo (Beaulieu et al., 2013) y caballa (Ennaas et al., 2015), caseína de la leche de camello (Kumar et al., 2016).

2.1.1.3.6. Actividad quelante y transportador de minerales. Las fuentes vegetales han demostrado contener proteínas capaces de liberar péptidos quelantes de minerales. Proteínas de salvado de arroz hidrolizadas con alcalasa y aromazima generaron péptidos capaces de unir al hierro (Foong et al., 2015). De Oliveira et al. (2015) emplearon proteasas de la bacteria *Chryseobacterium* sp. kr6 para obtener hidrolizados de proteínas de soja, capaces de quelar hierro en función de la proporción enzima/sustrato.

Las fuentes animales contienen proteínas capaces de liberar péptidos que pueden cumplir alguna actividad biológica. Proteínas de la leche y derivados lácteos han manifestado poseer actividades quelantes de minerales (Figueroa-Hernández et al., 2012, Fajardo- Espinoza et al., 2020), subproductos de pescado como pieles y huesos, han demostrado contener proteínas, gelatina y colágeno frecuentemente, que liberan péptidos con actividad quelante de metales

(Walters et al., 2018).

2.1.1.3.7. Actividad multifuncional. En algunos alimentos, los péptidos bioactivos obtenidos ofrecen actividad multifuncional. En la proteína de amaranto se conoce la capacidad antioxidante, inhibidora de la ECA y de la enzima dipeptil peptidasa IV (Martínez, 2017); en quinua la capacidad antidiabética, antihipertensiva, antioxidante y anticancerígena (Vilcacundo Chamorro, 2017), y la actividad antioxidante e inhibidora de la ECA en proteínas de lentejas (García-Mora et al., 2017) y proteínas del salvado de arroz (Wang et al., 2017). En las proteínas de yema de huevo ha sido referida la actividad antioxidante, inhibidora de la ECA y antidiabética (Zambrowicz et al., 2014), también péptidos derivados de leche fermentada por cepas específicas de *L. plantarum* fueron evaluados con respecto a la actividad antiinflamatoria, antihemolítica, antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2017).

2.1.2. Hierro en la Alimentación Humana

2.1.2.1.Importancia del Hierro en la Alimentación Humana. El hierro es un mineral necesario para las funciones biológicas del organismo humano, por ejemplo, en el transporte del oxígeno a través de la hemoglobina y su almacenamiento a través de la mioglobina, también actúa como cofactor de enzimas. A nivel mundial, la insuficiencia nutricional de su consumo es la principal causa que afecta a niños, mujeres gestantes y no gestantes (Yañez y Ayerbe, 2021). Esta enfermedad de prevalencia severa provoca la incapacidad del transporte de oxígeno a los tejidos, la reducción de cantidad y función de las células rojas, también conocida como ferropenia (OMS, 2020).

La OMS y el BM indican que casi el 50 % de los niños y niñas menores de 5 años tienen anemia a nivel mundial, señala su origen en las diferencias socioeconómicas y recomienda como alternativa su adición a través de su enriquecimiento, diversificación y suplementación

(OMS, 2020). El hierro debe estar presente en todas las etapas de la vida y especialmente en la dieta de los infantes entre los primeros meses de vida (de 0 a 12 meses). Según Natural Institutes of Health (2022) menciona que la falta del consumo de hierro podría afectar el crecimiento y desarrollo motor de los niños. Entre los síntomas más comunes de la anemia se presentan la debilidad, falta de energía, problemas respiratorios, mareos, pérdida de peso y dolores de cabeza; teniendo en cuenta que, si no se tratan a tiempo, podrían provocar serios riesgos para la salud. Los requerimientos del mineral dependen de la edad y sexo, en el caso de mujeres gestantes, su requerimiento es mayor que aquellas no gestantes (Rovati, 2020).

2.1.2.2. Biodisponibilidad y Antinutrientes. El hierro se clasifica en hemínico (presente en carnes rojas y blancas) con una biodisponibilidad del 30 %, y no hemínico (presente en alimentos de origen vegetal, sales elementales, en la leche y huevos) con una biodisponibilidad del 10 %. Su absorción se produce en el duodeno y parte del yeyuno, el pH gástrico favorece el paso de estado de férrico ($Fe+3$) a ferroso ($Fe+2$), acción necesaria para que pueda ser absorbido cuando logra atravesar la pared intestinal. La pérdida del hierro se puede dar por el sudor, exfoliación de membranas mucosas, mudanza de células de la piel y pérdidas gastrointestinales mínimas, dando como suma total aproximada de 1 mg/día en adultos, 2 mg/día en lactantes, 5 mg/día en niños de 6 a 11 años; por lo que las pérdidas necesitan ser recuperadas mediante su ingesta a través de los alimentos o suplementos nutricionales. Su absorción puede ser inhibida por los fitatos, olifenoles, calcio y fosfatos; y puede ser contribuido por la vitamina C, ácido cítrico, péptidos con cisteína, etanol y productos fermentados (Badui Dergal, 2006).

En los alimentos, el hierro en forma ferroso ($Fe+2$) puede contribuir a la auto oxidación y a la rápida descomposición de hidroperóxidos a sustancias volátiles donando un

sólo electrón del radical. Diversos componentes del alimento influyen en la quelación del mineral, haciendo énfasis que los aminoácidos como His, Glu, Asp y Cys, son capaces de resultar en compuestos solubles con el hierro. Por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas que presentan los péptidos bioactivos determinarán la capacidad de formación del complejo péptido-mineral y por consiguiente su fácil absorción. Péptidos bioactivos de bajo peso molecular y con alto contenido en Cys en su estructura podrían ser considerados buenos formadores de complejos péptido-hierro (Vargas Ramírez, 2018).

2.1.2.2.1. Actividad quelante del hierro en caseína. El término “quelato” proviene de la palabra griega “chela”, que significa “pinza”, el quelato formado presenta la forma similar de brazos de una pinza que captura el metal. Las moléculas de agua que rodean a los iones metálicos son reemplazadas por un agente quelante llamado también ligando y que adquiere formas complejas. Es importante señalar que el cuerpo humano no es capaz de metabolizar metales pesados cuando son detectados, por lo que permanecen en él dispuestos a reaccionar con otras sustancias, provocando toxicidad; razón por la cual se estudian fuentes proteicas que generen péptidos bioactivos con actividad quelante para eliminarlos (Solano Abad, 2017; Walters et al., 2018; Du et al., 2016; Abdel-Hamid et al., 2017).

La capacidad quelante de minerales que poseen los péptidos bioactivos de las proteínas lácteas, radica en sus regiones fosforiladas dentro de su secuencia aminoacídica y que además las hacen resistentes al proceso de hidrólisis enzimática gastrointestinal. Estudios in vivo han demostrado la acumulación de péptidos fosforilados luego de su liberación en la región intestinal, lugar donde son absorbidos todos los nutrientes como los minerales (Meisel y Frister, 1988, y Chabance et al., 1998 citados por Cruz Huerta, 2016). Precisamente los micronutrientes como Ca^{+2} , Zn^{+2} y Mg^{+2} pueden unirse a los péptidos fosforilados en condiciones alcalinas, el

complejo formado demuestra resistencia a las proteasas gastrointestinales en estudios in vivo (Mellander y Folsch, 1972 citados por Cruz Huerta, 2016). Boutrou et al. (2010) reportaron que el complejo formado, producto de la unión entre el péptido β -CN f (15-25)4P y los iones hierro, logra inhibir la acción enzimática de fosfatasas y peptidasas; planteando la posibilidad de que la actividad de la fosfatasa alcalina ubicada en el borde en cepillo favorecería la absorción del hierro unido a las regiones peptídicas fosforiladas mediante desfosforilación estructural, liberando el mineral (Cruz Huerta, 2016).

La caseína hidrolizada con tripsina o quimotripsina, libera péptidos caseinofosfopéptidos (CPP), capaces de quelar al calcio (Donida et al., 2009; Walker et al., 2006) como también al hierro (Kibangou et al., 2005). Estos CPP son reportados como mejoradores de la absorción y biodisponibilidad de los minerales mencionados, pero no aplica para todos los CPP generados, ya que su capacidad quelante depende de la procedencia como α 1, α 2 o β -caseína; Kibangou et al. (2005) afirman que el CPP de β -caseína capta mejor que el CPP de α 1-caseína cuando son quelados al hierro, debido a la diferencia estructural de ambos péptidos.

2.1.3. Proteínas

Estas macromoléculas cumplen roles indispensables para el funcionamiento y desarrollo celular, participando en reacciones metabólicas, en el transporte y almacén de nutrientes y oxígeno, la formación de la estructura tisular, transmisión nerviosa, en contracciones musculares, motilidad celular, coagulación sanguínea, en sistemas inmunológicos, hormonas y moléculas reguladoras entre otros (Nagai y Taniguchi, 2019).

La cadena peptídica empieza siempre con el aminoácido metionina y a través de su grupo carboxilo se une al α -amino de otro aminoácido formando un dipéptido (Müller-Sterl, 2008), su estructura de enlace formado -CO-NH-, unión peptídica o enlace peptídico y el prefijo “di”

indica la formación de dos aminoácidos (Aktnis & Jones, 2012), mediante proceso de condensación y formación de una molécula de agua (figura 2). Es así que el grupo carboxilo libre del dipéptido permite la repetición continua para la biosíntesis de las proteínas, cuya cadena polipeptídica contiene el primer grupo α - amino (amino terminal) y el último grupo carboxilo (carboxilo terminal). La unidad aminoacídica que forma parte del polipéptido es denominada resto (Müller- Sterl, 2008), las cadenas formadas hasta por 10 restos son denominadas oligopéptidos, más de 10 restos forman cadenas polipeptídicas, las proteínas son cadenas conformadas por más de 50 restos (Müller-Sterl, 2008).

La composición aminoacídica, regiones hidrófilas e hidrofóbicas, con cargas positivas, negativas o sin carga entre otros, definen la función de las proteínas (Loveday, 2019) así como su valor nutricional, digestibilidad, toxicidad y funcionalidad tecnológica en los alimentos (Gálvez et al., 2006).

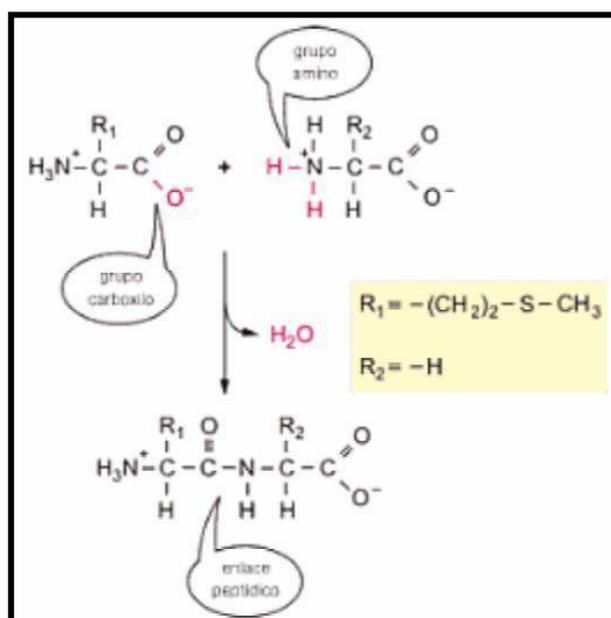
2.1.3.1. Proteínas lácteas. Estas proteínas se caracterizan por el aporte de proteínas de alto valor biológico, en leche esta fracción oscila entre 3-4 % (Maza y Legorreta, 2011), dependiendo de factores que pueden ser de tipo fisiológico, alimentario, climático, genético y zootécnico (Alais, 1985). Las proteínas lácteas aportan los aminoácidos necesarios y nitrógeno orgánico para la síntesis y reparación de tejidos (Maza y Legorreta, 2011). En adición, contienen propiedades funcionales de gran importancia en la industria alimentaria. (Phadungath, 2005).

2.1.3.2. Caseína. La caseína es un complejo proteico fosforado que gracias a sus cargas eléctricas e hidrofobicidad puede formar agregados coloidales (micelas) con otras caseínas. Las micelas de caseína están compuestas por 92 % de proteína y 8 % de constituyentes inorgánicos, principalmente fosfato cálcico (Hernández-Ledesma, 2002), siendo relevante su aporte en aminoácidos, calcio y fósforo inorgánico (Maza y Legorreta, 2011). Amiot (1991) y Alais

(1985), manifiestan que la caseína en la leche se encuentra en forma de fosfocaseinato de calcio y la estabilidad micelar puede ser alterada por acidificación del medio a pH 4.6 (en su punto isoeléctrico).

Figura 2

Estructura del enlace peptídico



Nota. El proceso de condensación que forma el dipéptido y enlace peptídico, libera una molécula de agua. Fuente: (Müller-Sterl, 2008).

La micela de caseína está formada por fracciones de α , β y k-caseína unidas por interacciones hidrófobas de partes apolares de las caseínas que contienen un núcleo hidrófobo secuestrado por una capa polar formada de grupos fosfóricos de α y β -caseína. Las micelas se unen a través de interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos de α y β -caseína con los iones calcio, de forma directa o en cadenas empleando fosfato y citrato agregando así las submicelas cubiertas por k-caseínas. La fracción k-caseína presenta moléculas poco fosforiladas,

muy polares e incapaces de unirse a los iones calcio, por lo que generan repulsión (Primo Yúfera, 1997; Belitz y Grosch, 1997; Coultate, 1998).

Las caseínas micelares pueden ser aisladas por métodos físicos (centrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño) o mediante agentes químicos (precipitación) utilizando ácidos, alcohol, enzimas o cuajo y metales pesados (Kramm Vásquez, 2003). Las proteínas lácteas pueden ser separadas con facilidad en caseína y lactosuero, lo que facilita sucesivas extracciones y purificaciones (Swaisgood, 2003).

2.1.3.2.1. Clasificación de la Caseína. Estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración y ultra centrifugación) ponen de manifiesto la existencia de 4 tipos de caseínas principales y son: α 1-caseína (α 1-CN), α 2-caseína (α 2-CN), β -caseína (β -CN) y k- caseína (k-CN), presentes en proporción molar media de 3:0.8:3:1 respectivamente. Otros grupos de proteínas en mínimas cantidades pueden ser incluidas como la γ - caseína (γ -CN) que es un fragmento proteico resultado de la proteólisis de la β -CN, y la κ -caseína que deriva de la α 1-CN (Ferrandini et al., 2006). García et al. (2014) afirman que las caseínas confieren estabilidad a la fracción proteica de la leche, es decir evitan agregaciones y precipitados de las proteínas frente a cualquier tipo de estrés.

Los diferentes tipos de caseínas poseen características particulares como por ejemplo la α y β -CN son sensibles a los iones calcio, y la k-CN es insensible frente a dicho ión, contribuyendo de esta manera estabilidad a la micela de caseína en la leche (Cid Rodríguez, 2004). Las caseínas sensibles al calcio, la α -CN es muy soluble frente al ión (Rey, 2009). La α 1-CN, presente en mayor concentración en la leche, es una proteína con alto grado de fosforilación, conformada por 199 aminoácidos con 17 residuos de prolina, 8 a 9 grupos fosfato que interaccionan con los iones calcio, 3 regiones apolares o hidrofóbicas que contribuyen a la estabilidad micelar y 1 dominio

con alta polaridad o hidrofílica (de carga negativa) donde están presentes la mayoría de grupos fosfatos, generando un pH de 6.6 en la leche (García et al., 2014).

La α_2 -CN es la más hidrofílica de todas las caseínas, la más fosforilada con 3 regiones de fosfoserina y posee la mayoría de residuos de aminoácidos catiónicos. También posee una parte hidrofóbica en su zona C-terminal y zona central. Su estructura le permite formar interacciones electrostáticas importantes en función del pH y alta sensibilidad a iones calcio (Rey, 2009). Contiene 207 aminoácidos con 13 grupos fosfatos dispuestos a interactuar con los iones calcio, algunos restos de prolina y cisteínas formando un único enlace disulfuro (García et al., 2014).

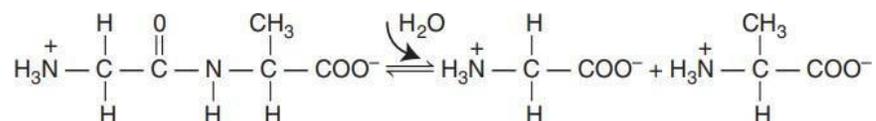
La β -CN es el tipo de caseína que contiene 209 aminoácidos y 5 grupos fosfato dispuestos a interactuar con el calcio, no se evidencia presencia de cisteína, pero contiene el mayor número de residuos de prolina. Existe una división marcada entre su zona polar (por el extremo N-terminal) y apolar dominada por una alta cantidad de aminoácidos hidrofóbicos (por el extremo C-terminal).

Debido a la alta hidrofobicidad y gran contenido de residuos de prolina, la β -CN cumple funciones de plegamiento en la formación micelar (García et al, 2014), no precipita con facilidad ante la presencia de calcio (Pariona Escarlante, 2014), debido al poco contenido de fósforo. La β -CN se comporta de diferente forma cuando se encuentra como monómero o cuando están formando micelas, ya que en ésta última la β -CN es menos susceptible de sufrir hidrólisis de proteasas como pepsina, tripsina o plasmina; sin embargo, a bajas temperaturas ($< 4\text{ }^\circ\text{C}$) puede perder la estructura micelar por acción de las enzimas. Por lo que, la γ -CN es el resultado de la fragmentación de la zona C-terminal de la β -CN, y las proteosa-peptonas como resultado de la fragmentación de la zona N-terminal de dicha caseína (Rey, 2009).

La k-CN está constituida por 169 aminoácidos, sus residuos de serina glucosilan varios segmentos de la molécula, a diferencia de otras caseínas, cuenta con un sólo grupo fosfato promoviendo la interacción limitada con el ión calcio. Esta fracción estabiliza la micela evitando que precipiten las α -CN y β -CN por efecto del calcio (García et al., 2014).

Es el sustrato específico de acción de la quimosina, sustancia presente en el cuajo, conformada por un N-terminal o para-kappa-caseína (con residuos hidrófobos, electropositivos) siendo la fracción precipitada, y una parte C-terminal (carboxilo glicopeptídico hidrófilo, electronegativo) que permanece soluble. La k-CN es un trímero constituido por tres cadenas polipeptídicas que se unen de forma intermolecular por enlaces disulfuro, contiene un trisacárido conformado (galactosa, galactosamida y ácido siálico). Elevados contenidos de calcio en una suspensión de caseína, generan rupturas del complejo α s-k porque la α s y el β -CN precipitan ante la presencia del ión, y la k-CN se mantiene en solución. Existen tres tipos de asociaciones: α s-k, β -k y α s- β , donde la más fuerte se considera la α s-k, formada por enlaces hidrófobos de tipo Van der Waals (interacciones de grupos no polares más concurrentes en las caseínas) (Cid Rodríguez, 2004).

2.1.3.2.2. Hidrolizados de Caseína. Se requiere de mucha energía para formar un enlace peptídico a temperatura ambiente y en un medio acuoso, por lo que no es favorable termodinámicamente; pero esta reacción en dichas condiciones puede lograrse a través del proceso de hidrólisis del enlace peptídico (figura 3) (Gálvez et al., 2006). En la figura 3 se observa, hacia la derecha de la reacción el equilibrio está muy desplazado, la hidrólisis sin catalizadores es lenta por la meta estabilidad de los polipéptidos. Existen diferentes maneras de catalizar una reacción de hidrólisis proteínica (Gálvez et al., 2006).

Figura 3*Hidrólisis del enlace peptídico*

Nota. La figura muestra el proceso de hidrólisis del enlace peptídico con acción de la molécula de agua. Fuente: (Gálvez et al., 2006).

La hidrólisis de proteínas es producto de la degradación a péptidos y/o aminoácidos libres por efecto de la ruptura del enlace peptídico. Existen diferentes vías de reacción como la fermentación, hidrólisis enzimática, química (ácidos o bases) o por digestión gastrointestinal (Udenigwe y Aluko, 2012). El uso de métodos químicos es poco empleado por efectos adversos generados que podrían afectar la calidad nutricional del producto final. El empleo de enzimas reduce el efecto de formación de compuestos no deseados (Belagardi, 2011). Las enzimas proteolíticas pueden provenir de fuentes animales, vegetales y microbianas. En la tabla 6 se muestra una lista de enzimas, con sus respectivas fuentes de obtención, estudiadas por diferentes autores.

Tabla 6*Enzimas aplicadas en la producción de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática*

Enzima	Fuente	Actividad (a)	Condiciones óptimas	Tiempo (b)	Referencias
Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	≥2,4 U / g	pH 7,5; 25 °C	4	Kumar y col. (2016)
Quimotripsina	Páncreas bovino	≥40 U / mg	pH 7,8; 37 °C	4	Kumar y col. (2016)

Pepsina	Mucosa gástrica porcina	2500 U / Mg	pH 2,0; 37 ° C	4	Chaudhari y col. (2017)
Tripsina	Páncreas porcino	30 U / g	pH 7,0; 37 ° C	4	Mirzaei y col.(2018)
Elatasa	Páncreas porcino	≥4 U / mg	pH 8,0; 37 ° C	1	Bamdad y col.(2017)
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	≥500 U / g	pH 7,0; 50 ° C	1	Bamdad y col. (2017)
Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	≥16 U / g	pH 7,0; 55 ° C	1	Bamdad y col. (2017)
Termolisis	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	14 U / g	pH 7,0; 50 ° C	1	Bamdad y col. (2017)
Pancreatina	Páncreas porcino	≥100 U / mg	pH 7,5; 40 ° C	4	Cauchara y col. (2017)
Papaína	Hoja de la planta de papaya	≥10 U/mg	pH 7,0; 65 ° C	4	Kumar y col. (2017)

(a) Cantidad de sustrato en moles convertidos en producto por unidad de tiempo

(b) Duración de la hidrólisis

Nota. Datos tomados del artículo científico de Mada et al. (2019).

El grado de hidrólisis de proteínas predice las características de los hidrolizados y a partir de ello sus posibles aplicaciones; es el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en función de la proteína original. Varios factores determinan el resultado del grado de hidrólisis, como la concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH, temperatura y naturaleza de la enzima empleada. Este último factor es caracterizado por su actividad específica

y tipo de actividad de la enzima; esto nos demuestra que no sólo influye en el grado de hidrólisis, sino también en los tipos de péptidos que resulten (Benítez et al., 2008). Los hidrolizados generados para fines alimentarios se dividen en 3 grupos: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (1 al 10 %), como mejoradores de las propiedades funcionales; hidrolizados con grados de hidrólisis variable, empleados como saborizantes; e hidrolizados extensivos (>10 %), aplicados para alimentos cualificados (Benítez et al., 2008).

Generalmente la hidrólisis proteica con enzimas, se ejecuta en un reactor donde se controla la agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato proteico puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano; y su elección estará en función al uso que se le va dar al hidrolizado que se obtenga y a su valor agregado comparado con el sustrato de partida (Benítez et al., 2008). El sustrato es colocado en agua hasta obtener los parámetros de pH y temperatura estables, luego se agrega la enzima proteolítica que hidrolizará la proteína; se genera una disminución del pH conforme va progresando la reacción por ruptura de enlaces peptídicos. Cuando se emplean enzimas, se debe mantener el pH al óptimo para mantener su actividad, por lo que se adiciona base diluida. Para interrumpir la hidrólisis proteica, se debe inactivar la enzima a través de calor, disminución de pH o una combinación de ambos; también se puede ejecutar a través de filtración (Benítez et al., 2008).

Rizzello et al. (2016) afirman que las proteínas alimentarias no sólo son empleadas como nutrientes sino también son capaces de cumplir funciones fisicoquímicas importantes para mejorar la salud, a través de la activación de sus péptidos liberados de la proteína de origen. Proteínas de plantas, de animales, de hongos, de microbios y de sus productos son fuente de péptidos bioactivos (Daliri et al., 2017).

2.1.3.2.3. Uso y Aplicaciones de Caseína en la Industria Alimentaria. La caseína puede ser extraída mediante métodos químicos empleando ácidos (minerales u orgánicos), y métodos enzimáticos empleando cuajo (enzima quimosina) (Becerra y Paz, 2009), es empleada con diversos fines, tales como su uso en la fabricación de revestimientos, adhesivos, emulsiones, plásticos y fibras. En la industria alimentaria, es base de la industria de productos lácteos tales como yogur, queso, mantequilla, manjar blanco, fórmulas infantiles, entre otros; además de su aplicación como ingrediente y/o insumo en la elaboración de una gama de alimentos y bebidas. Otras aplicaciones son sus hidrolizados para mejorar su aprovechamiento y absorción a nivel gastrointestinal.

2.1.4. Bacterias Proteolíticas en Crustáceos Marinos

2.1.4.1. Bacterias Obtenidas de Residuos de la Industria Langostinera. El langostino es un crustáceo decápodo de cuerpo alargado que habita los mares de todo el mundo, específicamente en fondos arenosos, cuevas, resquicios bajo piedras y raíces sumergidas donde pasan la mayor parte del tiempo alimentándose de algas, gusanos, moluscos, restos de animales muertos, peces y otros crustáceos (García-Guerrero et al., 2013). El Perú es uno de los principales países exportadores en América Latina de la especie *Litopenaeus vannamei*, siendo los departamentos de Tumbes y Piura como los mayores productores (PNIPA, 2021).

Según el Ministerio de la Producción, en el año 2018 ambos departamentos tuvieron una producción total de 31.5 mil toneladas aproximadamente, siendo la principal forma de consumo de langostinos del tipo congelados (81%) y la diferencia de consumo fresco. Las principales formas de exportación de langostino son: Colas con caparazón, sin caparazón y enteros (PNIPA, 2021). De esta industria se estima el considerable residuo, ya que los residuos generados se encuentran en rangos de 58 a 61% (IMARPE-ITP, 1996). Estos desechos industriales acuícolas

son descartados generando problemas de impacto ambiental; sin embargo, representan un sustrato que podría ser aprovechado para generar subproductos de importancia comercial (Bergheim et al., 2000). Según Toyos Vargas (2016), estos subproductos marinos pueden otorgar valor agregado para la obtención de proteínas, péptido, aminoácidos, enzimas, extractos, atractantes, aceites, DHA, EPA, fosfolípidos, gelatina, minerales, ácidos nucleicos, quitosano, glucosamina, astaxantina, vitaminas liposolubles e hidrosolubles y biopolímeros. Por ejemplo, Sirvas et al. (2021) analizaron los residuos de langostinos e identificaron bacterias proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas y quitinolíticas; y concluyeron que los desechos de la industria langostinera podrían ser aprovechadas en la obtención de subproductos de interés comercial y otras aplicaciones industriales.

2.1.4.2. Bacterias proteolíticas obtenidas de:

2.1.4.2.1. Género *Bacillus*. El género pertenece a la familia Bacillaceae que describe más de 50 especies identificadas. Son microorganismos bacilares, gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterótrofos móviles y de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos, catalasa positivos y se encuentran distribuidos ampliamente en diferentes tipos de ambientes como el suelo (Aslim et al., 2002), los ecosistemas de agua dulce (Mandal et al., 2005) y los marinos (Miranda et al., 2008), así como en ecosistemas extremos (Kayode-Isola et al., 2008). También pueden hallarse en alimentos, materia vegetal y tracto gastrointestinal de los animales (Córtes-Sánchez et al., 2017).

Una diversidad de especies son empleadas como indicadores de desinfección o esterilización, otras son capaces de producir antibióticos, vitaminas, enzimas, intervienen en la solubilización de fosfatos, fijación biológica del nitrógeno, y otras aplicaciones de interés industrial en áreas como la farmacéutica, alimentos, ambiental, entre otros (Kim et al., 2010;

GharaeiFathabad, 2011; Jacques, 2011). Como se mencionó, el género *Bacillus* puede ser hallado en una diversidad de ambientes como los marinos. Zheng et al. (2005) aislaron 42 cepas con actividad antimicrobiana provenientes de invertebrados marinos, algas, aguas de mar y sedimentos; siendo las bacterias marinas pertenecientes a los géneros *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium*. Pucci et al. (2009) identificaron bacterias marinas en muestras de agua de mar y sedimentos del intermareal, un total de 469 cepas fueron aisladas siendo el género *Bacillus* uno de los reportados. Miravet et al. (2003) identificaron géneros y especies de bacterias marinas y géneros de hongos, aislados de los arrecifes de la plataforma SW cubana, siendo *Bacillus sp.* uno de los géneros hallados. Justo et al. (2014) aislaron 20 cepas bacterianas de muestras aleatorias en el mar de Playa Cantolao-La Punta- Callao, cuyos géneros identificados fueron *Moraxella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Alcaligenes*, *Streptococcus* y *Chromobacterium*.

Bacillus velezensis es una bacteria aeróbica, gram positiva, formadora de endosporas, lo cual posee grupos de genes específicos de cepa relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios, que desempeñan un papel importante tanto en el crecimiento de plantas y biocontrol de fitopatógenos (hongos, bacterias, virus, nemátodos, etc.) (Rabbee et al. 2019). Bacteria hallada en diferentes ambientes como suelo, agua, aire, rizósfera vegetal, humano, animal, alimentos fermentados, etc. (Alenezi et al., 2021). Diferentes cepas de *B. velezensis* identificadas han sido objeto de estudio (Lee et al., 2015; Baptista et al., 2018; Rabbee et al. 2019; Cheffi et al., 2019). En el 2005, se aisló la cepa tipo FZB42 de *B. velezensis* del río Velez en Torredelmar-España (Ruíz-García et al., 2005), y se tiene más de 200 secuencias de genomas de cepas de *B. velezensis* disponibles en GenBank.

2.1.4.2.2. Género *Shewanella*. Asignado a un conjunto de microorganismos hallados en

una diversidad de hábitats como arena, agua y sedimentos marinos, minas de carbón, petróleo, y otros. Es una Gammaproteobacteria, perteneciente al orden Alteromonadales y familia *Shewanellaceae*; cuyo género está conformado por más de 60 especies que poseen la capacidad de utilizar una variedad de sustratos como aceptor final de electrones durante la respiración; además se caracterizan por ser bacilos gram negativos de 1-3 μm de tamaño y móviles por un flagelo polar, y pueden tener un metabolismo aeróbico o anaeróbico facultativo (Hau y Gralnick, 2007; Janda y Abbott, 2014; Yousfi et al., 2017). El género *Shewanella* agrupa especies que habitan en una variedad de condiciones como nutrientes, salinidad, temperatura, potencial redox, presión y en asociación con otros organismos; por lo cual la versatilidad de sus especies abre paso a futuras investigaciones en diversidad genómica.

La especie *Shewanella putrefaciens* por lo general ha sido hallada en aguas marinas y pescados en mal estado (Jørgensen y Huss, 1989; Stenström y Molin, 1990). Owen et al. (1978) mostraron que dicha especie comprende al menos cuatro grupos genómicos separados (I-IV), lo cual uno de dichos grupos (IV) fue reclasificado como nueva especie con nombre *Shewanella alga*. Pero los tres grupos genómicos restantes todavía están clasificados dentro de la misma especie (Vogel et al., 1997 y Rosselló-Mora et al., 1994 citados por Ziemke et al., 1998). Por otro lado, algunas especies como *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella haliotis* han sido asociadas a la aparición de ciertas enfermedades de la piel y hepatobiliares, infecciones de tejidos blandos, entre otros. En adición, las cepas de *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella xiamenensis*, *Shewanella oneidensis* y *Shewanella frigidimarina* podrían servir como medios de transmisión de genes de resistencia a antibióticos (Janda y Abbott., 2014; Yousfi et al., 2017).

Shewanella spp. es otra denominación para referirse a especies no identificadas o sin

clasificar (National Center for Biotechnology Information, 2020). Son capaces de utilizar diversos sustratos como aceptor final de electrones durante la respiración. Dichos sustratos pueden ser elementos tóxicos y metales insolubles (Hau y Gralnick., 2007; Janda y Abbott., 2014). Se reportan hallazgos lo cual se pretenden especificar las especies de *Shewanella* spp. (Saticioglu et al., 2021; Li et al., 2020).

2.1.5. Enzimas Proteolíticas Bacterianas

Las proteasas o proteinasas son un grupo de enzimas que rompen los enlaces peptídicos e hidrolizan las proteínas, pueden ser proteasas comerciales de origen vegetal (papaína, ficina y bromelina), animal (pepsina, tripsina y quimotripsina, renina) y microbianas (de hongos y bacterias) (Quirasco y López- Munguía, 2006). Cumplen funciones importantes en la ejecución de muchos procesos metabólicos y regulatorios. Las enzimas proteolíticas de origen microbiano son más ventajosas frente a las de origen animal y vegetal por su estabilidad, facilidad de manejo y bajos costos de producción (Buleje Alfaro, 2017).

Según su actividad catalítica, las proteasas se dividen en dos grupos: endopeptidasas, aquellos que rompen enlaces internos de la cadena proteica; exopeptidasas, aquellas que rompen enlaces terminales de la cadena. El segundo grupo se pueden dividir en aminopeptidasas (rompen enlace N-terminal) y carboxipeptidasas (rompen enlaces C-terminal) (Belagardi, 2011).

Todos los microorganismos generan proteasas con la finalidad de consumir fuentes de nitrógeno complejas; y aquellas extracelulares y producidos en gran cantidad son aplicados a nivel industrial. Son usados para generar hidrolizados con importancia nutricional en alimentos; para la recuperación de proteínas provenientes de materiales de desperdicio como sangre, vísceras y pescado; para modificar el gluten de la harina de trigo. También han contribuido en modificaciones proteicas con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales (Quirasco y

López-Munguía, 2006).

2.1.5.1. Factores que Afectan la Velocidad de Reacción Enzimática. La velocidad de reacción enzimática depende de diferentes factores como el pH del medio al que se somete, así como la temperatura, cantidad de sustrato y/o enzimas empleadas, entre otros (Quirasco y López-Munguía, 2006).

-Efecto del pH: la concentración de iones hidronio en el medio afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, su sitio activo, del sustrato o de la unión enzima sustrato. Por lo que, las enzimas trabajan a pH óptimos y se desnaturalizan (alteración de estructura) a pH extremos.

-Efecto de la temperatura: a mayor temperatura, mayor velocidad de reacción, teniendo en cuenta que temperaturas muy altas podrían afectar la capacidad catalítica de las enzimas porque al ser proteínas, estas se desnaturalizan y pierden su actividad. En general, el rango de temperatura óptima dentro del cual trabajan las enzimas está entre 30 y 45 °C, y sobre los 60 °C las enzimas se inactivan.

-Efecto de la concentración de sustrato: la función de la enzima es mejor cuando la concentración de sustrato es mayor que la de enzimas. Esto favorece en ejecutarse la reacción a velocidades altas, todo lo contrario, sería si la cantidad de enzimas sea mayor que la de sustratos generándose una disminución en la velocidad de reacción.

-Efecto de la actividad de agua (A_w): las enzimas son capaces de actuar incluso a mínimos valores de a_w como en el caso de aquellas enzimas no inactivas en alimentos deshidratados. Otro ejemplo se da con las lipasas contenidas en aceites puros, que actúan con un mínimo de agua. Es así que la disponibilidad del sustrato favorece las reacciones enzimáticas

pese a las condiciones bajas de aw. La acción de algunas enzimas que actúan en medios con baja aw es producto del equilibrio entre disolventes orgánicos no miscibles con el agua o el reemplazo de este último con disolventes miscibles como el glicerol.

-Efecto de otros agentes en la actividad enzimática: otros factores influyen en la capacidad catalítica de las enzimas como la fuerza iónica que modifica el sitio activo de las enzimas, los iones de metales pesados que inhiben la acción enzimática, y caso contrario con su activación afectada por la acción de varios cationes y aniones.

2.1.5.2.Hidrólisis de Proteínas por Acción de Enzimas Bacterianas. Se ha obtenido péptidos bioactivos a partir de enzimas bacterianas. Por ejemplo, Yamamoto et al. (1994) emplearon una proteinasa asociada a la pared celular de la bacteria *Lactobacillus helveticus* CP790, para hidrolizar caseínas y detectar la presencia de péptidos bioactivos derivados inhibidores de la ACE. Saracho Álvarez (2011) obtuvo péptidos bioactivos antioxidantes a partir de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* aislados de diferentes ecosistemas (lácteos artesanales, vegetales y cultivos iniciadores comerciales). Lombardi (2018) estudio la coagulación de la leche bovina inducida por extractos enzimáticos de origen fúngico (*Aspergillus niger* NRRL3) y otro bacteriano (*Bacillus* sp. P7), evaluando sus propiedades fisicoquímicas de los geles obtenidos y con posterior aplicación en productos de quesería. Hafeez et al. (2013) estudiaron la acción enzimática extracelular de dos cepas de *Streptococcus thermophilus* con diferente fenotipo sobre la leche, observando actividades de tipo aminopeptidasa extracelular que se originan en las superficies de dichas células; por lo que concluyeron que el empleo de leches fermentadas como vector de péptidos bioactivos y la estabilidad de los mismos, implica el estudio previo de la acción proteolítica superficial de las enzimas de *Streptococcus thermophilus*.

Por otro lado, se reporta la capacidad proteolítica que poseen algunas enzimas de bacterias marinas y que pueden ser aplicadas con fines industriales (CORDIS, 2019). Por ejemplo, Sánchez et al. (2004) aislaron 26 cepas de bacterias marinas con capacidad proteolítica provenientes de agua de mar contaminada con efluentes pesqueros, empleando caseína como sustrato. Entre las cepas identificadas, *Pseudomonas sp.* fueron las que resultaron con la mayor actividad proteolítica de sus enzimas, seguida de *Alcaligenes sp.* y *Aeromonas sp.* León et al. (2000) aislaron cepas productoras de enzimas extracelulares con actividades múltiples siendo una de ellas proteolítica. Un total de 102 cepas de bacterias marinas fueron aisladas de invertebrados intermareales y bentónicos en la Bahía de Ancón, así también de muestras de conchas de abanico y ostras recolectadas en la Bahía de Pucelana e Isla de San Lorenzo-Callao. Se empleó agar marino con sustratos complementarios como la caseína. Se identificaron cepas del género *Vibrio* como predominante, seguido de los géneros *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Flexibacter*. León Quispe en el año 1996, aisló cepas con actividad enzimática extracelular e inhibidoras frente a bacterias ictiopatógenas del neuston marino, identificándolas como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Micrococcus*. Zheng et al. (2005) aislaron 42 cepas con actividad antimicrobiana provenientes de invertebrados marinos, algas, aguas de mar y sedimentos; siendo las bacterias marinas pertenecientes a los géneros *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium*. Pucci et al. (2009) identificaron bacterias marinas en muestras de agua de mar y sedimentos del intermareal, un total de 469 cepas fueron aisladas siendo el género *Bacillus* uno de los reportados.

2.1.6. Técnicas de Análisis

2.1.6.1. Técnicas de Análisis en Proteína. Actualmente diferentes industrias a nivel mundial adoptan técnicas de ensayo como aquellas relacionadas al análisis de proteínas para los

productos que fabrican.

Dichos ensayos también son aplicados para fines de investigación como por ejemplo en la determinación de la actividad específica (actividad total/proteína total) de enzimas, cuya exactitud y precisión de resultados depende en parte de la medición precisa de la proteína total, lo cual trae consigo los siguientes puntos a considerar: la sensibilidad y técnica del método, definición clara de unidades, compuestos que interfieren, eliminación de sustancias que interfieren antes de analizar muestras, y correlación de información a partir de diversas técnicas (Lovrien y Matulis, 1995). Se hace referencia a las técnicas de análisis aplicadas en el presente estudio.

2.1.6.1.1. Determinación de Proteínas Solubles por Método de Lowry. El método de Lowry (Lowry et al., 1951) es una técnica de análisis colorimétrico que determina la cantidad de proteínas solubles presente en el sistema por efecto de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu con los grupos fenólicos de las proteínas en la muestra analizada. Es así que una disminución de los valores de Lowry indica una menor concentración de proteínas. Se emplea una curva estándar de Tirosina o Albúmina sérica bovina (estándares comunes empleados), cuya ecuación lineal permite despejar la variable a cuantificar.

2.1.6.2. Técnicas de Análisis Enzimático. Son técnicas empleadas por los investigadores para identificar la presencia o cantidad de una enzima en el organismo, tejido o muestra. La elección de las condiciones apropiadas para el análisis enzimático depende de la sensibilidad requerida. Las técnicas de análisis enzimático pueden ser aplicadas con fines de detección o de cuantificación utilizando reactivos fluorescentes. Los procedimientos de análisis enzimático son modificados en función al pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de los componentes en el ensayo, y en general de acuerdo con los requisitos específicos de la enzima en estudio, ya que

su actividad depende de varios factores (Sigma Aldrich, s.f.).

2.1.6.2.1. Actividad Enzimática. Uno de los análisis de detección de la actividad enzimática es a través de un ensayo colorimétrico basado en la evaluación de la actividad enzimática por hidrólisis de azocaseína (sustrato). El cambio de coloración rojo a amarillo producido demuestra el grado de hidrólisis por acción de la enzima estudiada y su medida se realiza mediante espectrofotometría (García-Carreño et al., 1993).

2.1.6.2.2. Grado de Hidrólisis de Proteínas. Es un ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática resultante de la relación porcentual entre los enlaces peptídicos escindidos por mol de sustrato respecto al número total de enlaces por mol de sustrato. El reactivo utilizado en el presente estudio es el reactivo sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, que reacciona con los grupos aminos libres en presencia de tetraborato de sodio, dando como resultado una coloración amarilla que puede ser medido en el espectrofotómetro. Un elevado grado de hidrólisis es el resultado de mayor presencia de grupos aminos libres en el sistema (Dumay et al., 2004).

2.1.6.3. Técnicas de Análisis en Hierro. Actualmente, industrias a nivel mundial realizan análisis para la determinación de hierro en los productos que fabrican o medios/superficies en estudio; también los investigadores aplican técnicas de análisis en hierro para los estudios que requieran. En el caso de los alimentos, la determinación de componentes químicos como el hierro, puede ser realizada obteniendo resultados muy exactos de manera práctica. Uno de los métodos es la espectrofotometría UV VIS que emplea la luz para medir las concentraciones de las sustancias químicas. El fundamento de esta técnica se explica por el efecto que produce un fotón al atravesar una muestra, pasando de un estado basal a uno excitado (incremento de la energía de la molécula). La intensidad provocada por el paso de muchos fotones a través de la muestra que contiene el analíto, es atenuada por efecto de la absorción y medida por

la absorbancia (Leslie, 1991; Lozano, 2004; Kirk, 2006 citados por Arango et al.,2012).

2.1.6.3.1. Determinación de la actividad quelante de hierro. Según la AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), para la determinación de hierro se emplea el método de la orto-fenantrolina. Este último reacciona con el Fe+2, produciendo un complejo de color rojo característico (ferroina) que absorbe notablemente a una longitud de onda de 510 nm. considerando que, a dicha longitud de onda, el Fe+3 no presenta absorción, debe ser reducido a Fe+2 empleando un agente reductor apropiado como la hidroxilamina en medio ácido (pH 3-4), mismo medio donde la orto-fenantrolina se halla en su forma protonada como ion 1,10-fenantrolin (FenH+). La reacción se describe en la siguiente ecuación:



Para determinar la concentración final de hierro en la muestra analizada, se debe realizar una curva de calibración preparando varias concentraciones conocidas de hierro (5 a 10 puntos). La ecuación resultante permite determinar la cantidad de hierro en la muestra, expresada en unidades porcentuales de hierro libre o quelado.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de Investigación

3.1.1. *Según su Finalidad es Aplicativa*

Esta investigación tuvo la finalidad de evaluar la bioactividad (quelación de hierro) de péptidos derivados de caseína.

3.1.2. *Según el Objetivo es Experimental*

Ya que se manipuló y controló de forma activa las variables independientes (hidrolizados de caseína generados por las enzimas bacterianas), y se evaluó su influencia en las variables dependientes en la obtención de péptidos bioactivos (capacidad quelante de hierro).

3.1.3. *Según el Marco en el que Tiene Lugar es de Laboratorio*

Por ser un espacio con las instalaciones, materiales, instrumentos y equipos necesarios que permitieron un mejor control del estudio para obtener resultados confiables.

3.2. **Ámbito Temporal y Espacial**

Fue desarrollada en el laboratorio de Físicoquímica de la Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica en el Instituto Tecnológico de la Producción. Carretera Ventanilla km 5, Callao.

3.3. **Variables**

3.3.1. *Operacionalización de las variables*

- *Variables independientes (VI):* Hidrolizados de caseína generada por enzimas bacterianas, son productos peptídicos por efecto de la acción de enzimas bacterianas al romper enlaces peptídicos de la caseína.

Indicador: Grado de hidrólisis (%)

Indicador: Actividad enzimática (mg azocaseína hidrolizada/20 ml muestra)

Indicador: Proteínas solubles (ug proteínas/20 ml muestra)

- ***Variables dependientes (VD):*** Capacidad quelante de hierro en los péptidos de caseína hidrolizados por enzimas bacterianas, es un tipo de actividad biológica que poseen los péptidos de caseína hidrolizada producto de la acción de enzimas bacterianas al sustrato.

Indicador: Fe quelado (%)

3.4. Población y Muestra

Hidrolizados de caseína obtenidos por enzimas microbianas se pueden considerar como una población infinita ya que el volumen que se puede producir esta en función a la cantidad de sustrato y enzimas que se pueden utilizar.

Se empleó la técnica de muestreo no probabilístico a través del método por juicio debido al bajo costo, por ser conveniente y por el poco consumo de tiempo.

De acuerdo al tipo de muestro considerado, el tamaño de la muestra para cada uno de los análisis fue de 4 (3.6.2 de Procedimientos) y 2 (3.6.3, 3.6.4 y 3.6.5 de Procedimientos) por tratamiento, siendo los extractos peptídicos crudos de caseína hidrolizados por enzimas microbianas procedentes de residuos de langostino, las muestras a analizar.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Obtención de Extracto Crudo Peptídico

3.5.1.1. Materiales.

20 tubos Falcon de 50 mL

1 gradilla para tubos Falcon

1 caja de Tecnopor mediano

6 gelpacks

1 bolsa de 500 microtubos descartables de 2mL

1 bolsa de 1000 tips de micropipeta descartables de 1mL

1 micropipeta Eppendorf de 100-1000 uL

3 gradillas para microtubos

1 vaso Beacker de 250 mL

1 par de guantes de Látex

1 plumón indeleble

3.5.1.2. Equipos.

1 centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL (Eppendorf, 5804 R)

1 centrífuga refrigerada para tubos de 2 mL (Sigma, 3-30KS)

1 congelador de -13 a -15 °C

1 balanza electrónica, r=5 Kg (A & D, GF 6100)

3.5.1.3.Reactivos.

250 mL de etanol absoluto (Merck)

3.5.1.4.Muestras.

4 matraces con 50 mL de caseína hidrolizada por 4 cepas bacterianas de residuos de langostino (1 cepa por matraz) y 1 matraz con 50 mL de caseína control, total de 5 matraces por tiempo de incubación (24 y 48 h).

Nota: las cepas bacterianas fueron procedentes del cepario del área de Biotecnología de la Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica en el Instituto Tecnológico de la Producción

3.5.2. Determinación Porcentual del Grado de Hidrólisis (%GH)

3.5.2.1.Materiales.

2 fioles de 10 mL, 50 mL y 250 mL c/u

2 barras magnéticas para tubos de ensayo cap. 20 mL

4 tubos de ensayo con tapa rosca, de 10 y 20 mL c/u

2 gradillas para tubos de ensayo

1 micropipeta Eppendorf de 20-200 uL

1 micropipeta Eppendorf de 100-1000 uL

1 pipeta de 5000 uL

1 cronómetro

10 embudos de vidrio

10 unidades de papel Whatman N° 125

10 tips de micropipeta de 200 uL y 1000 uL cada uno

1 punta de plástico para pipeta de 5000 uL

1 piseta con agua desionizada

2 pares de guantes de Látex

1 plumón indeleble

3.5.2.2.Equipos.

1 espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 180)

1 agitador de tubos (IKA, RT10)

1 calentador de bloques para tubos de ensayo

1 centrífuga para tubos de 2 mL (Sigma, 3-30KS)

1 estufa (Venticell-Eco line)

1 balanza analítica (OHAUS, DV214CSERI)

1 baño termostático (MEMMERT, WB1OSERI)

1 campana extractora

3.5.2.3.Reactivos.

Solución de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB o reactivo de Sanger) (Sigma-Aldrich)

Solución de tetraborato de sodio al 2 % (p/v) (Merck)

Ácido clorhídrico 6 N (Merck)

Glicina de grado analítico 99 %. (0.015 % p/v) (Biopack)

3.5.2.4.Muestras.

A=Muestra hidrolizada

Caseína en polvo

3.5.3. *Evaluación de la Actividad Proteolítica*

3.5.3.1.Materiales.

1 bolsa x 500 microtubos descartables nuevos de 2mL

1 bolsa x 1000 tips de micropipeta de 200 uL

1 bolsa x 1000 tips de micropipeta de 1000 uL

1 micropipeta Eppendorf de 20-200 uL

1 micropipeta Eppendorf de 100-1000 uL

3 gradillas para microtubos

2 vaso Beacker de 10 mL

1 rollo de parafilm

1 pisceta con agua desionizada

2 microplacas Coster de 96 pozos

2 pares de guantes de Látex

1 plumón indeleble

3.5.3.2.Equipos.

1 baño termostático (MEMMERT, WB1OSERI)

1 centrífuga para tubos de 2 mL (Sigma, 3-30KS)

1 microespectrofotómetro (BIOTEK Power Wave XS)

1 agitador de tubos (IKA, RT10)

3.5.3.3.Reactivos.

100 mL de azocaseína 2% (SIGMA-ALDRICH, USA)

100 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 8.5 (PROBIOTEK)

3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 100 % (MERCK)

3.5.3.4.Muestras.

A=Muestra hidrolizada

P=Extracto peptídico precipitado con etanol

S=Extracto peptídico soluble en etanol

3.5.4. *Cuantificación de Proteínas Solubles*

3.5.4.1.Materiales.

1 bolsa de 1000 tips de micropipeta de 200 uL

1 bolsa de 1000 tips de micropipeta de 1000 uL

1 gradilla de tubos de ensayo

100 tubos de ensayo cap. 5mL

1 micropipeta Eppendorf de 20-200 uL

1 micropipeta Eppendorf de 100-1000 uL

1 pisceta con agua desionizada

2 pares de guantes de Látex

1 plumón indeleble

3 vasos Beacker de 10 mL

3.5.4.2.Equipos.

1 espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 180)

1 agitador de tubos (IKA, RT10)

3.5.4.3.Reactivos.

250 mL de reactivo de Lowry

25 mL de reactivo de Foling

1 mL de Tirosina 0.03 % (Merck)

3.5.4.4.Muestras.

A=Muestra hidrolizada

P= Extracto peptídico precipitado con etanol

S= Extracto peptídico soluble en etanol

3.5.5. *Determinación de la Actividad Quelante de Hierro*

3.5.5.1. Materiales.

1 bolsa de 1000 tips de micropipeta de 200 uL

1 bolsa de 1000 tips de micropipeta de 1000 uL

1 gradilla de tubos de ensayo

100 tubos de ensayo cap. 5mL

1 micropipeta Eppendorf de 20-200 uL

1 micropipeta Eppendorf de 100-1000 uL

1 piseta con agua desionizada

2 pares de guantes de Látex

1 plumón indeleble

3.5.5.2. Equipos.

1 espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 180)

1 agitador de tubos (IKA, RT10)

3.5.5.3. Reactivos.

30 mL de sol. NaCl 0.9 % (Merck)

10 mL de sol. Sulfato ferroso 0.1 % (500 uM) (J.T. Baker)

20 mL de Fenantrolina 0.05 % en etanol (Alpha Chemika)

1mL de EDTA 0.01 % (J.T. Baker)

3.5.5.4. Muestras.

A=Muestra hidrolizada

P= Extracto peptídico precipitado con etanol

S= Extracto peptídico soluble en etanol

3.6. Procedimientos

3.6.1. Obtención de Extracto Crudo Peptídico

Las muestras fueron recibidas en condiciones de refrigeración en caja de Tecnopor con gelpacks proporcionadas por el laboratorio de biotecnología del ITP a través del convenio N°161-2017-FONDECYT. Dichas muestras fueron trasvasadas a tubos Falcon cap. 50 mL para su centrifugación (3000 rpm x 10 min. x 5 °C), previamente se verificó la equivalencia de pesos en los tubos conteniendo las muestras. Transcurrido el tiempo de centrifugación el sobrenadante (70 % aprox.) fue colocado en otro tubo Falcon. Sobrenadantes y pellets fueron mantenidos en refrigeración. Todos los tubos fueron debidamente rotulados.

A continuación, los sobrenadantes fueron centrifugados en microtubos de 2 mL (5 unidades por código de muestra) a 1000 rpm x 30 min. x 5 °C para separar una alícuota de 1mL por microtubo agregando etanol absoluto a 5 °C en relación de 1:3 (sobrenadante:etanol) y almacenando en congelación a -20 °C por 3 días.

Transcurrido el tiempo, los tubos Falcon con las muestras fueron centrifugados a 5000 rpm x 30 min. x 5 °C, el sobrenadante fue trasvasado de inmediato y el pellet obtenido fue hidratado con agua desionizada, homogenizado y almacenado en congelación hasta su análisis.

Nota: este procedimiento fue aplicado a dos períodos de fermentación: 24 y 48 h.

Las muestras fueron tratadas por duplicado por período de fermentación.

Tabla 7

Código de cepas bacterianas de residuos de langostino y el nombre de la especie perteneciente ().*

Código de cepa	Nombre de la especie
RL-15 (08)	<i>Shewanella putrefaciens group</i>
RL-15 (19)	<i>Shewanella sp.</i>
RL-15 (41)	<i>Shewanella sp.</i>
RL-15 (42)	<i>Bacillus velezensis</i>

Nota. * Denominación referida por el Laboratorio de Biotecnología del ITP

3.6.2. Determinación Porcentual de Grado de Hidrólisis (%GH)

Se determinó según metodología de Dumay et al. (2004), basada en la cuantificación de grupos aminos liberados en la hidrólisis a través de la reacción con el reactivo 1-fluoro- 2,4-dinitrobenceno (también llamado DNFB o reactivo Sanger) en presencia de tetraborato de sodio. La solución obtenida presenta color amarillo y su absorbancia es medida a una longitud de onda de 410 nm.

3.6.2.1.Preparación de Curva Estándar. La curva estándar fue preparada utilizando una solución de glicina 0.15 ug/uL, para lo cual 75 mg de glicina fueron disueltos en una fiola de 10 mL y de esta solución 1 mL fue diluido en fiola de 50 mL. Para las diluciones fue utilizada agua desionizada. La tabla 8 muestra las concentraciones tomadas para realizar la lectura en el espectrofotómetro.

Figura 4

Diagrama de flujo para la concentración de péptidos de caseína por hidrólisis enzimática de células bacterianas de residuos de langostino.

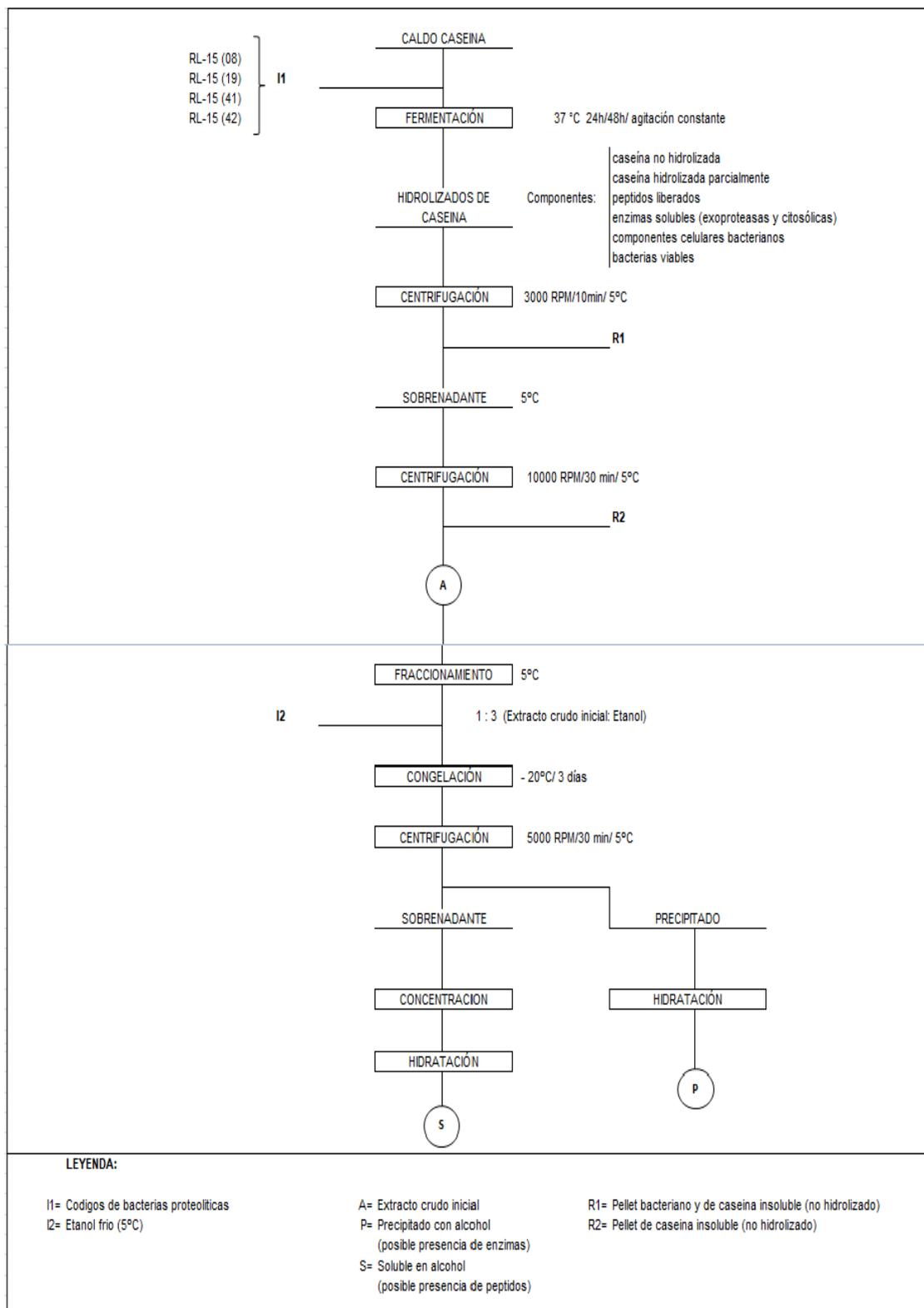


Tabla 8*Puntos de medición para la curva estándar glicina*

Nº Punto	Sol. Glicina (uL)	H ₂ O desionizada(uL)	Concentración final (ug)
0	0	1000	0
1	25	975	3.75
2	50	950	7.5
3	100	900	15
4	200	800	30
5	400	600	60

Nota: el punto "0" fue preparado por duplicado, uno como punto de

medición y otro para colocar en la celda durante la lectura de todas las muestras.

3.6.2.2.Hidrólisis Química Total de la Caseína. Se procedió a pesar 0.05 g de sustrato original (caseína en polvo) por duplicado en tubos de ensayo capacidad 20 mL, se agregó 10 mL de HCl en la campana extractora para cada tubo. Los tubos fueron cuidadosamente cerrados con sus tapas y sometidos a 100 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo, los hidrolizados de caseína fueron retirados y enfriados rápidamente para su filtración con embudo y papel Whatman en fiolas capacidad 250 mL, además de lavados sucesivos del pellet con agua desionizada para recuperar la mayor muestra posible y su enrase correspondiente.

De las soluciones obtenidas se tomaron dos alícuotas de 50 y 100 uL, y completados con agua desionizada hasta 1 mL.

3.6.2.3.Preparación de la Muestra. Las muestras en estudio (muestras hidrolizadas (A) para cada código de cepa) fueron diluidos al 1 % con agua desionizada, es decir, 10uL de muestra y el resto con agua hasta 1 mL.

Nota:

- Las muestras fueron los hidrolizados de caseína producto de la acción enzimática por

cepa bacteriana. La dilución de las muestras se realizó hasta obtener un factor que generó un valor de absorbancia comprendido dentro del rango de la curva estándar.

3.6.2.4. Cuantificación de Nitrógeno Amínico (en los Puntos de la Curva Estándar, Hidrólisis Total de la Caseína y Muestras Hidrolizadas). Como continuación de los procedimientos 3.6.2.1, 3.6.2.2 y 3.6.2.3, se procedió a agregar 1 mL de tetraborato de sodio (2 % p/v) a cada tubo de ensayo. En seguida, se adicionó 0.25 mL de reactivo Sanger incubando a 60 °C por 10 minutos y enfriando a temperatura ambiente. Luego se adicionó a cada tubo 2 mL de ácido clorhídrico 6 N para proceder a su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Todas las adiciones de reactivos fueron cuidadosamente homogeneizadas, y en el caso de ácido clorhídrico realizadas en campana extractora.

Las ecuaciones 1 y 2 permitieron el cálculo para determinar el contenido de nitrógeno amínico presente en las muestras en estudio y grado de hidrólisis.

Ecuación 1:

$$n \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{N.A. \frac{mg}{ml} \times Vol FS (ml)}{P (g)}$$

Donde:

$n (mg/g)$ = cantidad de nitrógeno amínico en miligramos por gramo de sustrato hidrolizado químicamente o muestra en estudio.

$N.A. mg/mL$ = cantidad de nitrógeno amínico en miligramos por mililitro de sustrato hidrolizado químicamente o muestra en estudio (proveniente de la cantidad de volumen empleado en el análisis para cada uno).

P = peso en gramos del sustrato hidrolizado químicamente o muestra en estudio.

FS = volumen de fracción soluble en mililitros, empleado en función de la muestra analizada.

Ecuación 2:

$$GH (\%) = \frac{n}{nT} \times 100$$

Dónde.

nT = cantidad total de nitrógeno amínico en equivalente de glicina por gramo de sustrato caseína.

n = cantidad de nitrógeno amínico por gramo de muestra hidrolizada (A)

3.6.3. Evaluación de la Actividad Proteolítica Enzimática

Se determinó según García-Carreño et al. (1993), mediante el método basado en la evaluación de la actividad enzimática por hidrólisis de azocaseína y cuantificación por espectrofotometría.

3.6.3.1. Muestras Hidrolizadas (A). La evaluación de la actividad proteolítica enzimática se realizó por duplicado en función al período de fermentación (24 y 48 h) y tiempo de hidrólisis enzimática (3, 6 y 18 h), empleando un sistema de evaluación en base a azocaseína (tabla 9).

Se procedió a rotular microtubos (por duplicado) en función a los códigos de las muestras (tabla 10). Posteriormente, se adicionó 100 ul del sustrato azocaseína 2 %, 500 uL de buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.5 y 200 uL de alícuota A (muestra hidrolizada) en cada microtubo.

De inmediato, se empleó el agitador de tubos para mezclar bien todos los constituyentes.

Tabla 9*Constituyentes del sistema de evaluación empleada*

Constituyente	Cantidad (uL)
Azocaseína 2 %	100
Buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.5	500
Alícuota A (muestra hidrolizada)	200
Ácido tricloroacético TCA 100 %	20

Tabla 10*Códigos de las muestras en evaluación (Muestra hidrolizada – A)*

Código de cepa y control	Periodo de incubación (h)	Código de análisis
BK	24	BK(24h)A
	48	BK(48h)A
RL-15 (08)	24	8(24)A
	48	8(48)A
RL-15 (19)	24	19(24)A
	48	19(48)A
RL-15 (41)	24	41(24)A
	48	41(48)A
RL-15 (42)	24	42(24)A
	48	42(48)A

Luego se sellaron los microtubos con parafilm (1 x 5 cm² aprox.) y se colocaron en baño termostático a 40 °C x 3, 6 y 18 h. con la finalidad de generar las condiciones adecuadas del medio para la acción de las enzimas en presencia del sustrato. Transcurrido el tiempo de

hidrólisis, se procedió a inactivar las enzimas, para lo cual se retiró la gradilla del baño termostático, se quitó el parafilm y se adicionó 20uL de ácido tricloroacético 100 % a cada microtubo. En seguida, se agitaron con el equipo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 1 h. Luego, se centrifugaron a 8000 rpm x2 min. y se tomó una alícuota de sobrenadante (200 uL) en microplacas para la lectura de absorbancia a 400 nm en el microespectrofotómetro.

3.6.3.2.Extractos Peptídicos Precipitados con Etanol (P) y Solubles en Etanol (S). La evaluación de la actividad proteolítica enzimática se realizó por duplicado en función al período de fermentación (24 y 48 h) y tiempo de hidrólisis enzimática (3, 6 y 24 h), empleando un sistema de evaluación en base a azocaseína (tabla 11).

Se procedió a rotular microtubos en función a los códigos de las muestras (tabla 12 y 13).

Posteriormente, se adicionó 100 uL del sustrato azocaseína 2 %, 500 uL de buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.5 y 200 uL de alícuota P o S en cada microtubo.

Tabla 11

Constituyentes del sistema de evaluación empleada

Constituyente	Cantidad (uL)
Azocaseína 2 %	100
Buffer Tris-HCl 0.05 M pH8.5	500
Alícuota P (precipitado con alcohol) o S (soluble en alcohol)	200
Acido tricloroacético TCA100 %	20

Posteriormente, se empleó el agitador de tubos para mezclar bien todos los constituyentes. Luego se sellaron los microtubos con parafilm (1 x 5 cm² aprox.) y se colocaron

en baño termostático a 40 °C x 3, 6 y 24 h. con la finalidad de generar las condiciones adecuadas del medio para la acción de las enzimas en presencia del sustrato. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se procedió a inactivar las enzimas, para lo cual se retiró la gradilla del baño termostático, se quitó el parafield y se adicionó 20uL de ácido tricloroacético 100 % a cada microtubo, se llevaron al agitador de tubos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 1 h. Luego, se centrifugó a 8000 rpm x 2 min. y se tomó una alícuota de sobrenadante (200 uL) en microplacas para la lectura de absorbancia a400 nm en el microespectrofotómetro.

Tabla 12

Códigos de las muestras en evaluación (precipitados con etanol -P)

Código de cepa y control	Periodo de incubación (h)	Código de análisis
BK	24	BK(24h)P
	48	BK(48h)P
RL-15 (08)	24	8(24)P
	48	8(48)P
RL-15 (19)	24	19(24)P
	48	19(48)P
RL-15 (41)	24	41(24)P
	48	41(48)P
RL-15 (42)	24	42(24)P
	48	42(48)P

Tabla 13

Códigos de las muestras en evaluación (solubles en etanol - S)

Código de cepa y control	Periodo de incubación (h)	Código de análisis
BK	24	BK(24h)S
	48	BK(48h)S

	24	8(24)S
RL-15 (08)	48	8(48)S
	24	19(24)S
RL-15 (19)	48	19(48)S
	24	41(24)S
RL-15 (41)	48	41(48)S
	24	42(24)S
RL-15 (42)	48	42(48)S

3.6.4. Cuantificación de proteínas solubles

Se midió la cantidad de proteínas solubles a través del método de Lowry (Lowry et al., 1951). Este método colorimétrico determina la cantidad de proteínas solubles presente en el sistema por efecto de la reducción del reactivo de Folin- Ciocalteau con los grupos fenólicos de las proteínas. Es así que una disminución de los valores de Lowry indica una menor concentración de proteínas por efecto de la capacidad proteolítica enzimática de las cepas bacterianas al sustrato caldo caseína. Se preparó una curva estándar con reactivo Tirosina.

Para la determinación de la curva estándar se formularon 7 puntos a diferentes concentraciones de reactivo estándar (tabla 14).

Para la evaluación de las muestras, se procedió a rotular tubos de ensayo (por duplicado) en función a los códigos de las muestras a evaluar (tabla 15) y se ordenaron en una gradilla. Se adicionó 500 uL de muestra y 2500 uL de reactivo de Lowry a cada tubo, de inmediato se taparon, se agitaron y se dejaron reposando en oscuridad por un tiempo de 20 min. Transcurrido el tiempo, se adicionó 250 uL de reactivo de Folin a cada tubo, se agitaron y se dejó reposar por 15 min.

Por último, los tubos ensayados fueron llevados al espectrofotómetro para la medición de la absorbancia a 550 nm.

Tabla 14*Constituyentes para la curva estándar*

H2O (uL)	Sol Tirosina 0.03 % (uL)	Reactivo Lowr y(uL)	Reactivo foling (uL)
475	25		
450	50		
425	75		
400	100	2500	250
350	150		
300	200		
250	250		

Tabla 15*Códigos de las muestras en evaluación*

Código de cepa y control	Periodo de incubación (h)	Extracto crudo inicial (A)	Precipitado con alcohol (P)	Soluble en alcohol(S)
BK	24	BK(24h)A	BK(24h)P	BK(24h)S
	48	BK(48h)A	BK(48h)P	BK(48h)S
RL-15(08)	24	8(24h)A	8(24h)P	8(24h)S
	48	8(48h)A	8(48h)P	8(48h)S
RL-15(19)	24	19(24h)A	19(24h)P	19(24h)S
	48	19(48h)A	19(48h)P	19(48h)S
RL-15(41)	24	41(24h)A	41(24h)P	41(24h)S
	48	41(48h)A	41(48h)P	41(48h)S
RL-15(42)	24	42(24h)A	42(24h)P	42(24h)S
	48	42(48h)A	42(48h)P	42(48h)S

3.6.5. *Determinación de la Actividad Quelante de Hierro Ferroso*

La determinación de la actividad quelante de hierro (+2) se basó según el método proporcionado por Essuman et al. (2017) con algunas modificaciones. Este método colorimétrico mide la capacidad quelante de una sustancia al hierro ferroso; una mayor capacidad quelante resulta de una baja absorbancia, manifestándose un ligero color naranja o ningún cambio apreciable. Caso contrario a mayor absorbancia, menor capacidad quelante de la sustancia evaluada, y por lo tanto habrá mayor hierro libre dispuesto a ser quelado por la fenantrolina como reactivo indicador manifestando un color naranja. Se realizó una curva estándar con reactivo EDTA.

Para la determinación de la curva estándar se formularon 6 puntos a diferentes concentraciones de reactivo estándar (tabla 16).

Tabla 16

Constituyentes para la curva estándar

H2O (uL)	Sol EDTA 0.01 % (uL)	H2O (uL)	Sol. NaCl 0.9 % (uL)	Sol. FeSO4 0.1 % (uL)	Sol. Fenantrolina 0.25 % (adicionado luego de 5 min.de reposo)
200	0				
180	20				
170	30				
160	40	400	400	100	250
150	50				
140	60				

Para la evaluación de las muestras (A, P y S), se procedió a rotular tubos de ensayo (por duplicado) en función a los códigos de las muestras a evaluar (tabla 9) y se ordenaron en una gradilla. Se adicionó 200 uL de muestra diluida (20 uL de muestra y se completó con agua

desionizada), 400 uL de agua desionizada, 400 uL de NaCl 0.9 % y 100 uL de Sol. FeSO₄ 0.1 % a cada tubo, de inmediato se taparon y se agitaron con movimientos suaves y pausados cada 10 s por 5 min., luego se adicionó 250 uL de Sol. Fenantrolina 0.25 % y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 510 nm.

3.7. Análisis de datos

Se empleo Microsoft office Excel 2007 para la recopilación de datos de todos los experimentos realizados. El análisis de los datos fue realizado utilizando el software estadístico GraphPad Prism., a un nivel significativo del 5 %.

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación Porcentual del Grado de Hidrólisis (%GH)

En la tabla 17 se muestra el resultado de las absorbancias de los puntos definidos para la curva estándar con glicina (variación de la concentración del aminoácido). La primera columna de la tabla muestra las diluciones elegidas para la curva, y la columna adyacente es el resultado de conversión de unidades, es decir, cantidad del aminoácido en ug por volumen de alícuota empleada en cada punto (Ver el ítem 3.6.2.1 de Procedimientos).

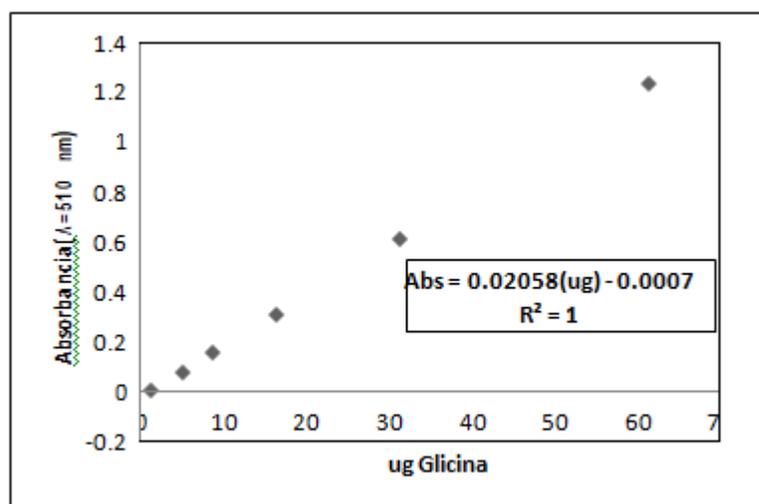
Tabla 17

Absorbancias para la curva Glicina

Gly (ul)	Gly (ug)	Absorbancia ($\lambda=410$ nm)
0	0	0
25	3.75	0.077
50	7.5	0.155
100	15	0.304
200	30	0.613
400	60	1.231

Figura 5

Incremento de valores de absorbancia por concentración de Glicina



Nota. Según la ecuación determinada, cuando los ug de Glicina se incrementan en 1 unidad, la absorbancia se incrementa en 0.02058 puntos. Así mismo, según el coeficiente de determinación R^2 , el 100 % de la absorbancia se debe a la concentración de glicina.

En la tabla 18 se muestra los resultados de grados de hidrólisis expresados en valor porcentual (%) para las muestras hidrolizadas (A).

Tabla 18

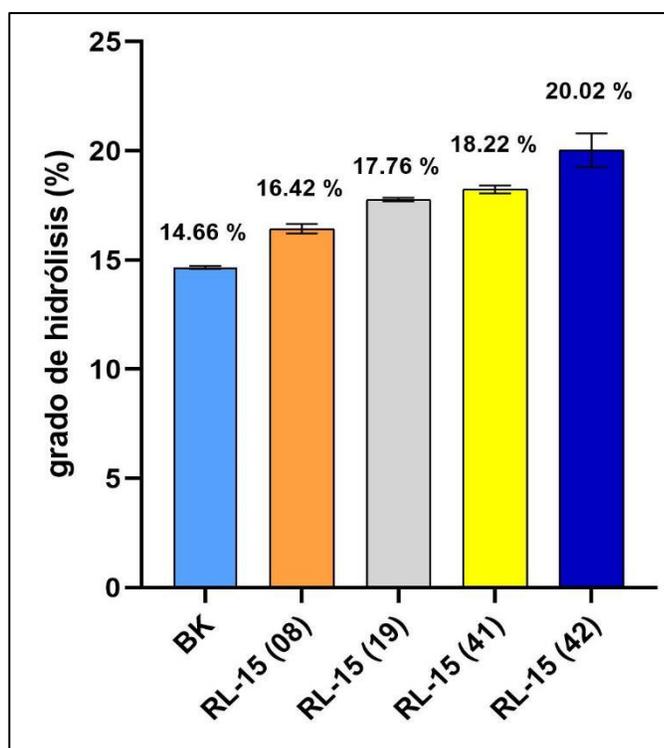
Grado de hidrólisis (%GH) por acción proteolítica de las células bacterianas⁽¹⁾

		CODIGO DE LA MUESTRA				
		BK	RL-15 (08)	RL-15 (19)	RL-15 (41)	RL-15 (42)
GH (%)		14.66	16.16	17.74	18.44	19.32
		14.66	16.33	17.65	18.27	19.41
		14.75	16.6	17.83	18	20.55
		14.57	16.6	17.83	18.18	20.82

(1) Resultados obtenidos en 4 réplicas o repeticiones

Figura 6

Grado de hidrólisis de la caseína por acción de las células bacterianas



Nota. Los promedios de grado de hidrólisis (%) obtenido por efecto de la acción de las enzimas bacterianas son diferentes observándose mayor efecto en el tratamiento RL-15(42), así mismo todos los tratamientos experimentales son mayores al tratamiento control BK.

Aplicando la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 1:

Ho: Todos los tratamientos tienen igual efecto en el grado de hidrólisis.

Ha: Alguno de los tratamientos tiene un efecto diferente en el grado de hidrólisis.

$\alpha = 0.05$

P valor = 0.0001

Decisión: $P \text{ valor} < \alpha$, entonces se rechaza H_0 , siendo la prueba significativa.

Como resultado de la prueba se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza H_0 ; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de los tratamientos sobre el grado de hidrólisis.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 2.

El número de comparaciones a realizar es de: 10.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional de los tratamientos “k” y “m” que están en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, que se presenta en el Anexo 2, se observa que los P valor de las comparaciones múltiples entre los promedios de los tratamientos son menores al valor de significancia $\alpha=0.05$, a excepción de la comparación entre los tratamientos RL-15 (41) vs RL—15 (19) cuyo P valor = 0.4331 es superior a $\alpha=0.05$.

Como resultado de la prueba se tiene lo siguiente:

Las comparaciones entre los tratamientos RL-15 (08) vs BK, RL-15 (19) vs BK, RL-15 (41) vs BK, RL-15 (42) vs BK, RL-15 (19) vs RL—15 (08), RL-15 (41) vs RL—15 (08), RL-15 (42) vs RL—15 (08), RL-15 (42) vs RL—15 (19) y RL-15 (42) vs RL—15 (41) son significativos, por lo tanto, sus promedios son diferentes.

La comparación entre los tratamientos RL-15(19) vs RL-15(41) es no significativo, por lo tanto, sus promedios son iguales.

4.2. Evaluación de la actividad proteolítica

4.2.1. Muestra hidrolizada (A)

En la tabla 19 se muestra los valores de absorbancia para la curva estándar con azocaseína ($\lambda=400$ nm).

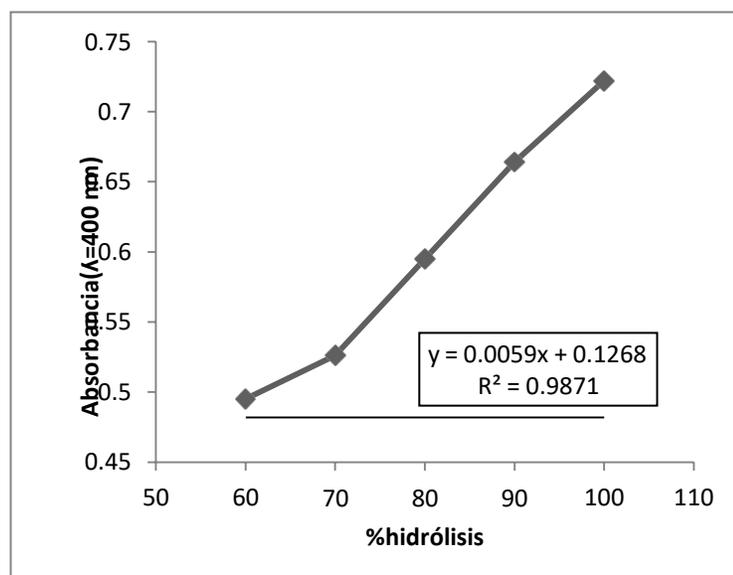
Tabla 19

Absorbancias para la curva estándar

sol. azoc 1% en buffer fosf. 8.5 (uL)	mg de azocaseína	% hidrólisis	Absorbancia ($\lambda=400$ nm)
200	2	100	0.722
180	1.8	90	0.664
160	1.6	80	0.595
140	1.4	70	0.526
120	1.2	60	0.495

Figura 7

Incremento de valores de absorbancia por efecto de azocaseína hidrolizada



Ecuación:

$$\text{Abs}_{(\lambda=400\text{nm})} = 0.0059 (\% \text{hidrólisis}) + 0.1268$$

Nota. Según la ecuación determinada, cuando la hidrólisis (%) incrementa en 1 unidad la absorbancia se incrementa en 0.0059 puntos. Así mismo, según el coeficiente de determinación R^2 , el 98.71 % de la variación de la absorbancia se debe a la cantidad de azocaseína hidrolizada.

En la tabla 20 se muestra los resultados de actividad proteolítica en muestras hidrolizadas (A) expresados en mg de azocaseína hidrolizada por enzimas producidas durante el proceso de fermentación microbiana en tiempos de 24 y 48 h.

Tabla 20

Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras A

Código de Muestra	Absorbancia ($\lambda=400$ nm)	% hidrólisis	mg azoc./20 ul muestra
BK(24h)A	0.000	0.000	0.000
BK(48h)A	0.000	0.000	0.000
8(24h)A	0.249	20.740	0.041
8(48h)A	0.272	24.554	0.049
19(24h)A	0.000	0.000	0.000
19(48h)A	0.000	0.000	0.000
41(24h)A	0.231	17.605	0.035
41(48h)A	0.177	8.537	0.017
42(24h)A	0.618	83.198	0.166
42(48h)A	0.306	30.316	0.061

4.2.2. Extracto precipitado con etanol (P)

En la tabla 21 se muestra los resultados de actividad proteolítica en extractos peptídicos precipitados con etanol (P) expresados en mg de azocaseína hidrolizada.

Tabla 21*Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras P*

Código de Muestra	Absorbancia ($\lambda=400$ nm)	% hidrólisis	mg azoc./20 ul muestra
BK(24h)P	0.090	0.000	0.000
BK(48h)P	0.100	0.000	0.000
8(24h)P	0.204	13.000	0.026
8(48h)P	0.265	23.339	0.047
19(24h)P	0.000	0.000	0.000
19(48h)P	0.000	0.000	0.000
41(24h)P	0.250	20.881	0.042
41(48h)P	0.255	21.644	0.043
42(24h)P	0.539	69.780	0.140
42(48h)P	0.321	32.915	0.066

4.2.3. Extracto soluble en etanol (S)

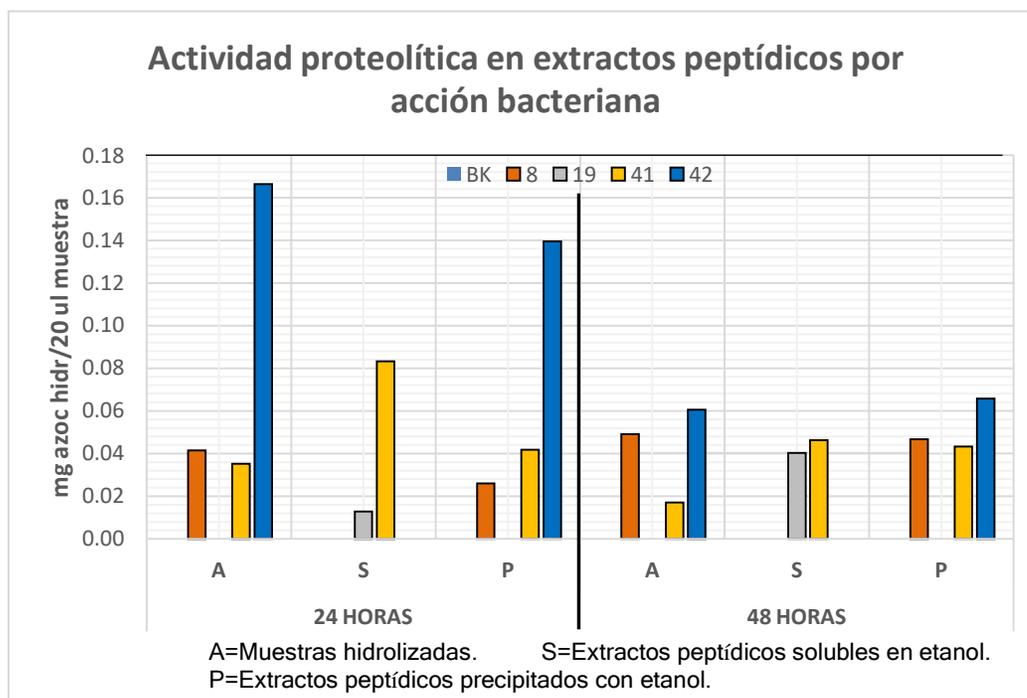
En la tabla 22 se muestra los resultados de actividad proteolítica en extractos peptídicos solubles en etanol (S) expresados en mg de azocaseína hidrolizada.

Tabla 22*Actividad proteolítica expresado en mg de azocaseína hidrolizada en muestras S*

Código de Muestra	Absorbancia ($\lambda=400$ nm)	% hidrólisis	mg azoc./20 ul muestra
BK(24h)S	0.110	0.000	0.000
BK(48h)S	0.100	0.000	0.000
8(24h)S	0.000	0.000	0.000
8(48h)S	0.000	0.000	0.000
19(24h)S	0.165	6.390	0.013
19(48h)S	0.246	20.119	0.040
41(24h)S	0.373	41.644	0.083
41(48h)S	0.264	23.169	0.046
42(24h)S	0.000	0.000	0.000
42(48h)S	0.000	0.000	0.000

Figura 8

Actividad proteolítica en extractos peptídicos por acción bacteriana



Nota. Los promedios de azocaseína hidrolizada (mg), obtenido por efecto de la acción de las enzimas bacterianas en ambos períodos, son diferentes; observándose que las muestras BK (caseína control) no evidenciaron actividad proteolítica en ningún tipo de fracción (A, S y P), en caso del código 41 se aprecia que para los tres tipos de fracción y en ambos períodos de fermentación, las muestras manifiestan actividad proteolítica. Se evidencia que las muestras código 19 no manifestaron actividad proteolítica luego de su fermentación (A); sin embargo, el empleo del etanol para concentrar los péptidos, hizo posible evidenciar actividad proteolítica como solubles al etanol mas no precipitados en él. Las muestras código 42 manifestaron actividad proteolítica luego de su fermentación (A) y como precipitados en etanol mas no solubles en éste.

Analizando estadísticamente la efectividad de los períodos de fermentación (24 y 48 h)

evaluada en las muestras tipo A, a través de la prueba de Fisher se tiene lo siguiente (ver Anexo 3)

Ho: Todos los tratamientos tienen igual efecto de actividad proteolítica entre los períodos 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos tiene un efecto diferente de actividad proteolítica entre los períodos 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

$$P \text{ valor} = 0.0008$$

Decisión: $P \text{ valor} < \alpha$, entonces se rechaza Ho, siendo la prueba significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza Ho; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de actividad proteolítica en los tratamientos entre períodos 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos logrados en 24 y 48 horas cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 4.

El número de comparaciones a realizar es de 5

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, de “k” y “m” que son los tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa que los P valor de las comparaciones múltiples entre los promedios de los tratamientos son mayores al valor de significancia $\alpha=0.05$, con excepción de los tratamientos A (24 h):42 vs. A (48 h):42, cuyo P valor = 0.0007.

Como resultado final se tiene lo siguiente:

Las comparaciones entre los tratamientos A (24 h):BK vs. A (48 h):BK, A (24 h):8 vs. A (48 h):8, A (24 h):19 vs. A (48 h):19 y A (24 h):41 vs. A (48 h):41 no son significativos, por lo tanto, sus promedios son iguales.

La comparación entre los tratamientos A (24 h):42 vs. A (48 h):42 es significativo, por lo tanto, sus promedios son diferentes.

Analizando estadísticamente la efectividad del etanol, evaluada en las muestras tipo S y P, a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 5:

Ho: Todos los tratamientos tienen igual efecto de actividad proteolítica entre los tipos de fracciones A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos tiene un efecto diferente de actividad proteolítica entre los tipos de fracciones A, S, y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

$$P \text{ valor} = 0.0180$$

Decisión: P valor $< \alpha$, entonces se rechaza Ho, siendo la prueba significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza H_0 ; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de actividad proteolítica entre los tratamientos para los tipos de fracción A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 6.

El número de comparaciones a realizar es de 27.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa lo siguiente:

Las comparaciones entre promedios de los tratamientos 8 A (24 h) vs. 8 S (24 h), 8 A (48 h) vs. 8 S (48 h), 8 S (48 h) vs. 8 P (48 h), 19 A (24 h) vs. 19 S (24 h), 19 S (24 h) vs. 19 P (24 h), 19 A (48 h) vs. 19 S (48 h), 19 S (48 h) vs. 19 P (48 h), 42 A (24 h) vs. 42 S (24 h) y 42 S (24 h) vs. 42 P (24 h) son diferentes, es decir hay diferencia significativa de la actividad proteolítica por efecto del etanol; y promedios de los tratamientos 8 P (24 h) vs. 8 P (48 h), 19 S (24 h) vs. 19 S (48 h), 41 S (24 h) vs. 41 S (48 h) y 42 P (24 h) vs. 42 P (48 h) son diferentes al comparar entre períodos para un mismo tipo de fracción (S y P).

La comparación entre los promedios de los tratamientos 8 A (24 h) vs. 8 P (24 h), 8 S (24 h) vs. 8 P (24 h), 8 A(48 h) vs. 8 P(48 h), 41 A(24 h) vs. 41 S(24 h), 41 A(24 h) vs. 41 P(24 h),

41 S(24 h) vs. 41 P(24 h), 41 A(48 h) vs. 41 S(48 h), 41 A(48 h) vs. 41 P(48 h), 41 S(48 h) vs. 41 P(48 h), 42 A(24 h) vs. 42 P(24 h), 42 A(48 h) vs. 42 S(48 h), 42 A(48 h) vs. 42 P(48 h), 42 S(48 h) vs. 42 P(48 h) son iguales, es decir no hay diferencia significativa de la actividad proteolítica por efecto del etanol, y 41 P(24 h) vs. 41 P(48 h) al comparar entre períodos para un mismo tipo de fracción (P).

4.3. Cuantificación de proteínas solubles

En la tabla 23 se muestran las absorbancias de los puntos definidos para la curva estándar con Tirosina (variación de la concentración del aminoácido).

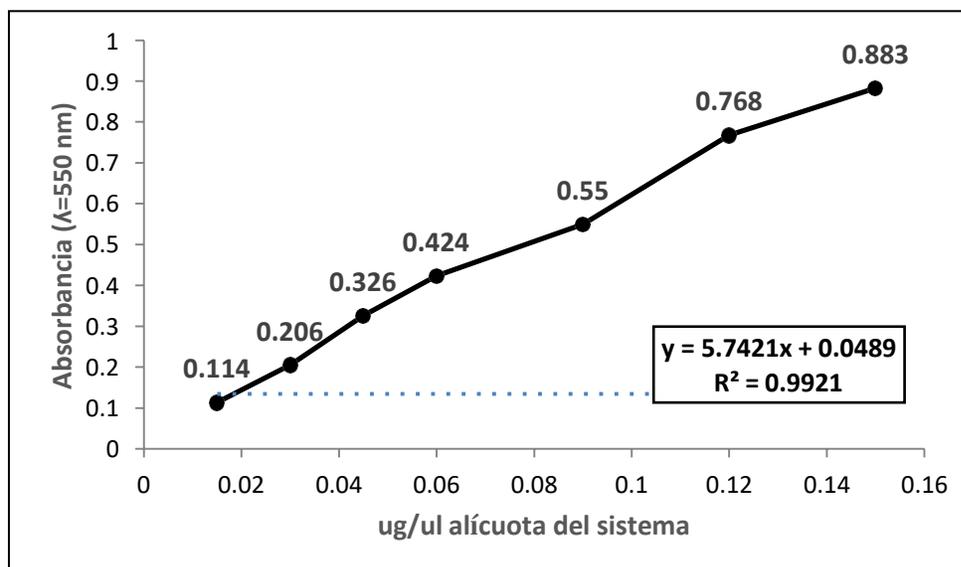
Tabla 23

Valores de Absorbancia para la Curva estándar de Tirosina

Concentración de tirosina (ul)	Cantidad de tirosina (ug)	ug/ul del alícuota del sistema	Absorbancia (550 nm)
25	7.5	0.015	0.114
50	15	0.03	0.206
75	22.5	0.045	0.326
100	30	0.06	0.424
150	45	0.09	0.55
200	60	0.12	0.768
250	75	0.15	0.883

Figura 9

Incremento de valores de absorbancia por cantidad de Tirosina en el sistema



Ecuación:

$$Abs_{(\lambda=550 \text{ nm})} = 5.7421(\text{ug/ul alícuota del sistema}) + 0.0489$$

Nota. Según la ecuación determinada, cuando los ug de Tirosina se incrementa en 1 unidad, la absorbancia se incrementa en 5.7421 puntos. Así mismo, según el coeficiente de determinación R^2 , el 99.21 % de la variación de absorbancia se debe a la concentración de Tirosina.

En la tabla 24 se muestran los resultados de la cantidad de proteína soluble expresado como ug tirosina por 20 ul de muestra analizada.

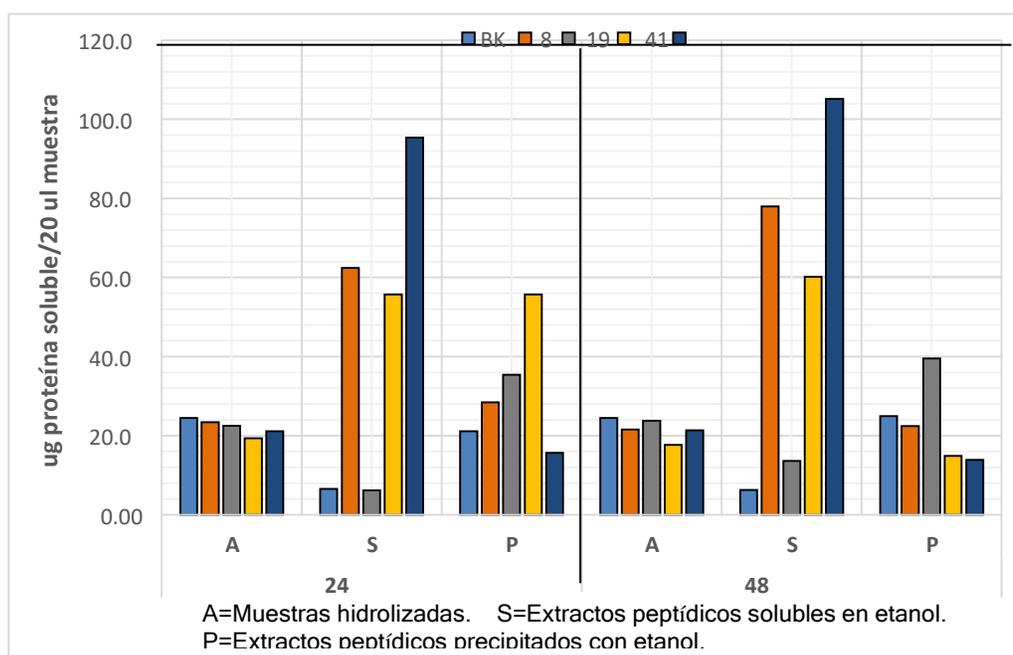
Tabla 24

Cantidad de proteína (ug/ul) en extractos solubles y precipitados de caseína hidrolizada

MUESTRA HIDROLIZADA (A)		EXTRACTO SOLUBLE EN ETANOL (S)		EXTRACTO PRECIPITADO CON ETANOL (P)	
código de cepa/tiempo de fermentación	ug proteína/20 ul de alícuota de muestra	código de cepa/tiempo de fermentación	ug proteína/20 ul de alícuota de muestra	código de cepa/tiempo de fermentación	ug proteína/20 ul de alícuota de muestra
BK(24h)A	24.45	BK(24h)S	6.55	BK(24h)P	21.11
BK(48h)A	24.49	BK(48h)S	6.29	BK(48h)P	24.92
8(24h)A	23.39	8(24h)S	62.36	8(24h)P	28.41
8(48h)A	21.56	8(48h)S	77.95	8(48h)P	22.38
19(24h)A	22.47	19(24h)S	6.20	19(24h)P	35.41
19(48h)A	23.78	19(48h)S	13.55	19(48h)P	39.48
41(24h)A	19.33	41(24h)S	55.75	41(24h)P	55.75
41(48h)A	17.68	41(48h)S	60.19	41(48h)P	14.89
42(24h)A	21.11	42(24h)S	95.37	42(24h)P	15.67
42(48h)A	21.30	42(48h)S	105.12	42(48h)P	13.85

Figura 10

Cantidad de proteína en extractos peptídicos por acción bacteriana



Nota. Los promedios de la cantidad de proteínas solubles (ug) por tipo de fracción (A, S y P), obtenidos por efecto de la acción de las enzimas bacterianas en ambos períodos, son diferentes; observándose que en los tres y para ambos períodos de fermentación existe presencia de proteínas solubles para todos los tratamientos. En adición, la efectividad del incremento del tiempo de fermentación (24 a 48 h), que se evidencia en todas las muestras hidrolizadas (A), no es notable.

Analizando estadísticamente la efectividad de los períodos de fermentación (24 y 48 h), verificada en las muestras tipo A, a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 7:

Ho: Todos los tratamientos tienen igual cantidad de proteínas solubles entre los períodos 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos tiene diferente cantidad de proteínas solubles entre los períodos 24 y 48 h.

$\alpha = 0.05$

P valor = 0.5612

Decisión: P valor $>$ α , entonces se acepta Ho, siendo la prueba no significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se acepta Ho; por lo tanto, se puede afirmar que no existen diferencias en la cantidad de proteínas solubles entre los tratamientos para ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 8.

El número de comparaciones a realizar es de 5.

$H_0: \mu_k = \mu_m$

$H_a: \mu_k \neq \mu_m$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$\alpha = 0.05$

Según la prueba Tukey, se observa que todos los P valor de las comparaciones múltiples entre los promedios de los tratamientos son mayores al valor de significancia $\alpha=0.05$.

Como resultado final se tiene lo siguiente:

Las comparaciones entre los tratamientos A(24 h):BK vs A(48 h):BK, A(24 h):8 vs A(48 h):8, A(24 h):19 vs A(48 h):19, A(24 h):41 vs A(48 h):41 y A(24 h):42 vs A(48 h):42 no son significativos, por lo tanto, sus promedios son iguales.

Analizando estadísticamente la efectividad del etanol, evaluada en las muestras tipo S y P, a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en los Anexos 9 y 11:

H_0 : Todos los tratamientos tienen igual cantidad de proteínas solubles entre los tipos de fracciones A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

H_a : Alguno de los tratamientos tiene diferente cantidad de proteínas solubles entre los tipos de fracciones A, S, y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

P valor = 0.0435 y 0.0258 (24 y 48 h respectivamente)

Decisión: P valor $< \alpha$, entonces se rechaza H_0 , siendo la prueba significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza H_0 ; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de actividad proteolítica entre los tratamientos para los tipos de fracción A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en los Anexo 10 y 12.

El número de comparaciones a realizar es de 29.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa lo siguiente:

Las comparaciones entre promedios de los tratamientos BK A (24 h) vs. BK S (24 h), BK S (24 h) vs. BK P (24 h), 8 A (24 h) vs. 8 P (24 h), 19 A (24 h) vs. 19 S (24 h), 19 A (24 h) vs. 19 P (24 h), 19 S (24 h) vs. 19 P (24 h), 41 A (24 h) vs. 41 S (24 h), 41 A (24 h) vs. 41 P (24 h), 42 S (24 h) vs. 42 P (24 h), BK A (48 h) vs. BK S (48 h), 19 A (48 h) vs. 19 S (48 h), 41 A (48 h) vs. 41 S (48 h), 41 S (48 h) vs. 41 P (48 h) son diferentes, es decir hay diferencia

significativa de la cantidad de proteínas solubles por efecto del etanol.

La comparación entre promedios de los tratamientos BK A (24 h) vs. BK P (24 h), 8 A(24 h) vs. 8 S(24 h), 8 S(24 h) vs. 8 P(24 h), 42 A(24 h) vs. 42 S(24 h), 42 A(24 h) vs. 42 P(24 h), BK A (48 h) vs. BK P (48 h), BK S (48 h) vs. BK P (48 h), 8 A (48 h) vs. 8S (48 h), 8 A (48 h) vs. 8P (48 h), 8 S (48 h) vs. 8P (48 h), 19 A (48 h) vs. 19P (48 h), 19 S (48 h) vs. 19P (48 h), 41 A(48 h) vs. 41 P(48 h), 42 A(48 h) vs. 42 S(48 h), 42 A(48 h) vs. 42 P(48 h) y 42 S(48 h) vs. 42 P(48 h) son iguales, es decir no hay diferencia significativa de la cantidad de proteína soluble por efecto del etanol.

4.4. Determinación de la actividad quelante de hierro

En la tabla 25 se muestra las absorbancias de los puntos definidos para la curva estándar con EDTA (variación de la concentración del antioxidante).

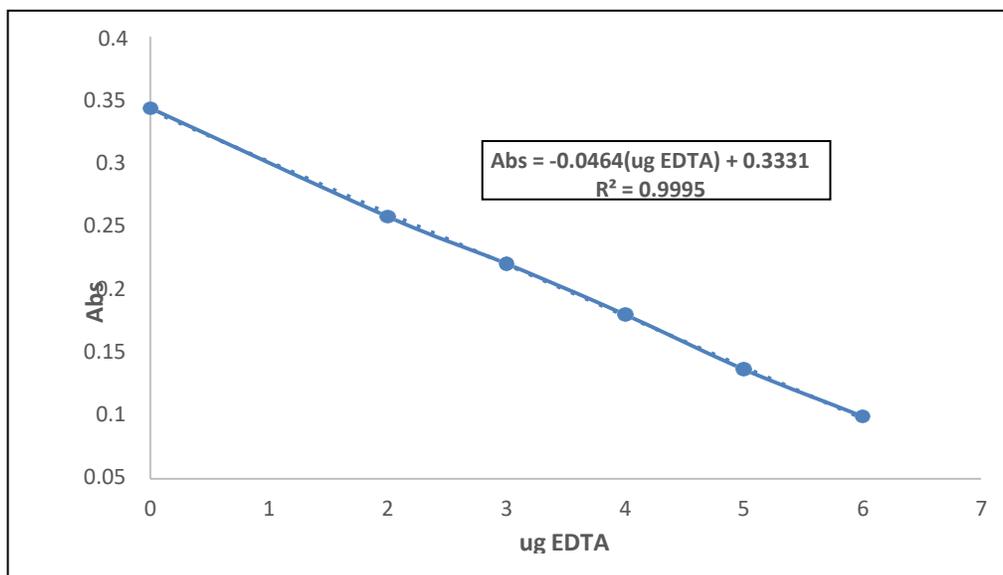
Tabla 25

Absorbancias para la curva EDTA

concentración de EDTA (ul)	cantidad de EDTA (ug)	Absorbancia ($\lambda=510$ nm)	%Hierro libre	%Hierro quelado
0	0	0.335	100	0.0
20	2	0.237	70.75	29.3
30	3	0.1945	58.06	41.9
40	4	0.1485	25.74	74.3
50	5	0.099	7.61	92.4
60	6	0.0565	1.28	98.7

Figura 11

Disminución de valores de absorbancia por cantidad de EDTA (ug)



Nota. Según la ecuación determinada, cuando los ug de EDTA se incrementan en 1 unidad, la absorbancia disminuye en 0.0464 puntos. Así mismo, según el coeficiente de determinación R^2 , el 99.95 % de la variación de la absorbancia se debe a la concentración de EDTA.

En la tabla 26 se muestran los resultados de la cantidad de hierro quelado y libre expresado en porcentajes (%) por tipo de fracción.

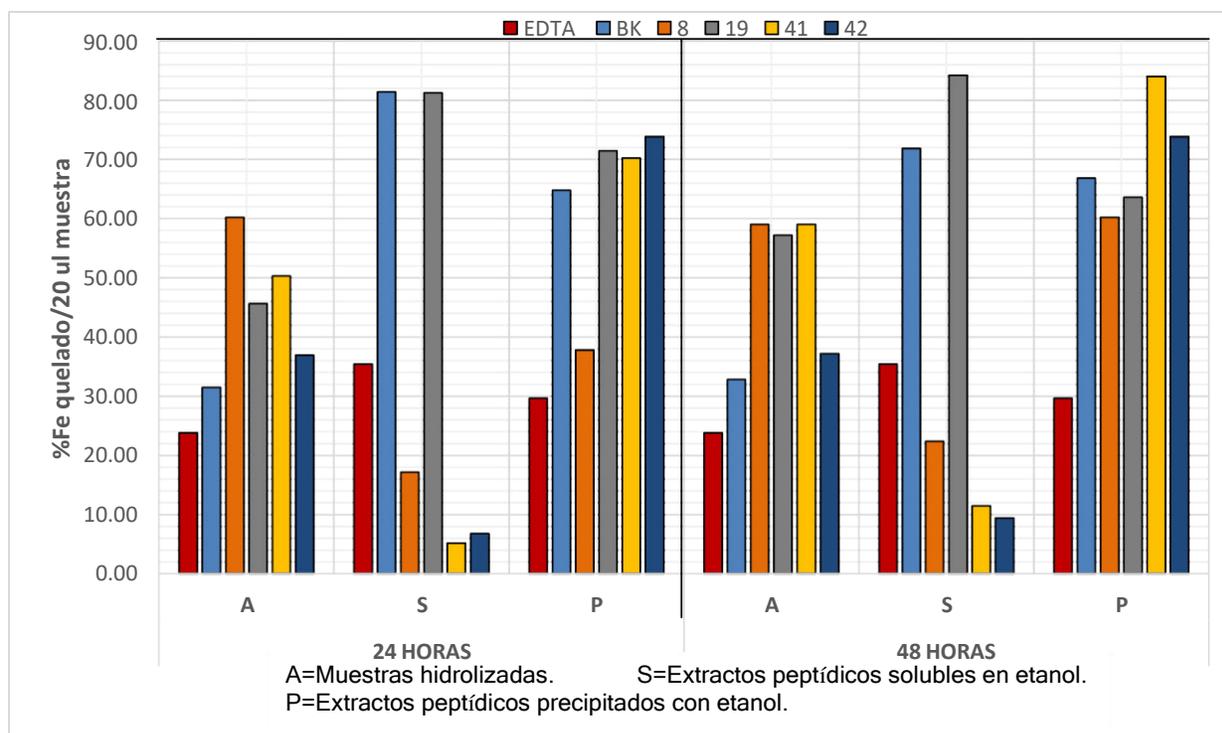
Tabla 26

Cantidad porcentual de Fe libre y quelado por efecto de extractos solubles y precipitados de caseína hidrolizada.

Código de muestra	ug EDTA/20 ul de extracto	%Fe libre/20 ul de extracto	%Fe quelado/20ul de extracto
MUESTRAS HIDROLIZADAS (A)			
EDTA (20UL)	1.672	76.20	23.80
BK (24H)A	2.297	68.51	31.49
BK (48H)A	2.394	67.16	32.84
8(24H)A	3.289	39.78	60.22
8 (48H)A	3.224	40.98	59.02
19 (24H)A	2.815	54.37	45.63
19 (48H)A	3.127	42.78	57.22
41 (24H)A	3.116	49.65	50.35
41 (48H)A	3.224	40.98	59.02
42 (24H)A	2.685	63.09	36.91
42(48H)A	2.707	62.79	37.21
EXTRACTO PEPTÍDICO PRECIPITADO CON ETANOL (P)			
EDTA (20UL)	2.470	70.32	29.68
BK (24H)P	3.838	35.18	64.82
BK (48H)P	3.946	33.18	66.82
8(24H)P	3.052	62.19	37.81
8 (48H)P	3.591	39.78	60.22
19 (24H)P	4.205	28.55	71.45
19 (48H)P	3.774	36.38	63.62
41 (24H)P	4.129	29.78	70.22
41 (48H)P	4.894	15.97	84.03
42 (24H)P	4.334	26.15	73.85
42(48H)P	4.334	26.16	73.84
EXTRACTO PEPTÍDICO SOLUBLE EN ETANOL (S)			
EDTA (20UL)	2.707	64.60	35.40
BK (24H)S	4.582	18.56	81.44
BK (48H)S	4.054	28.16	71.84
8(24H)S	1.349	82.82	17.18
8 (48H)S	1.705	77.62	22.38
19 (24H)S	4.571	18.76	81.24
19 (48H)S	5.293	15.79	84.21
41 (24H)S	0.530	94.80	5.20
41 (48H)S	0.961	88.49	11.51
42 (24H)S	0.638	93.22	6.78
42(48H)S	0.821	90.54	9.46

Figura 12

Actividad quelante de extractos peptídicos obtenidos por acción bacteriana



Nota. Los promedios de la cantidad de Fe quelado (%) por tipo de fracción (A, S y P), obtenidos por efecto de la acción de las enzimas bacterianas en ambos períodos, son diferentes. El compuesto EDTA empleado como quelante patrón es comparado con las muestras por cada tipo de fracción. En el caso de las muestras hidrolizadas (A), se observa que el código 8 es mayor al EDTA a comparación de las otras muestras en ambos períodos. En el caso de los extractos peptídicos solubles en etanol (S) se observa valores porcentuales mayores y menores al EDTA, siendo los códigos BK y 19 mayores al patrón en ambos períodos, y los códigos 08, 41 y 42 menores al patrón. Con respecto a los extractos peptídicos precipitados con etanol (P), se observa que todos los códigos superan al EDTA en ambos períodos de fermentación.

Analizando estadísticamente la actividad quelante de Fe en las muestras frente a la

actividad del patrón EDTA a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 13:

Ho: Todos los tratamientos poseen igual cantidad de Fe quelado (%) entre los tipos de fracciones A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos poseen diferente cantidad de Fe quelado (%) entre los tipos de fracciones A, S, y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

$$P \text{ valor} = 0.0295$$

Decisión: $P \text{ valor} < \alpha$, entonces se rechaza Ho, siendo la prueba significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza Ho; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de actividad quelante entre los tratamientos para los tipos de fracción A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 14.

El número de comparaciones a realizar es de 30.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa lo siguiente:

Las comparaciones entre los promedios de los tratamientos EDTA: A(24 h) vs. 8: A(24 h), EDTA: S(24 h) vs. BK: S(24 h), EDTA: S(24 h) vs. 19: S(24 h), EDTA: S(24 h) vs. 41: S(24 h), EDTA: P(24 h) vs. BK: P(24 h), EDTA: P(24 h) vs. 8: P(24 h), EDTA: P(24 h) vs. 19: P(24 h), EDTA: P(24 h) vs. 41: P(24 h), EDTA: P(24 h) vs. 42: P(24 h), EDTA: A(48 h) vs. BK: A(48 h), EDTA: A(48 h) vs. 19: A(48 h), EDTA: S(48 h) vs. BK: S(48 h), EDTA: S(48 h) vs. 19: S(48 h), EDTA: P(48 h) vs. BK: P(48 h), EDTA: P(48 h) vs. 8: P(48 h), EDTA: P(48 h) vs. 19: P(48 h), EDTA: P(48 h) vs. 41: P(48 h) y EDTA: P(48 h) vs. 42: P(48 h) son diferentes, es decir hay diferencia significativa de la cantidad de Fe quelado (%) con respecto al patrón EDTA.

Las comparaciones entre los promedios de los tratamientos EDTA: A(24 h) vs. BK: A(24 h), EDTA:A(24 h) vs. 19: A(24 h), EDTA:A(24 h) vs. 41: A(24 h), EDTA:A(24 h) vs. 42: A(24 h), EDTA:S(24 h) vs. 8: S(24 h), EDTA:S(24 h) vs. 42: S(24 h), EDTA:A(48 h) vs. 8: A(48 h), EDTA: A(48 h) vs. 41: A(48 h), EDTA:A(48 h) vs. 42: A(48 h), EDTA:S(48 h) vs. 8: S(48 h), EDTA:S(48 h) vs. 41: S(48 h) y EDTA:S(48 h) vs. 42: S(48 h) son iguales, es decir no hay diferencia significativa de la cantidad de Fe quelado (%) con respecto al patrón EDTA.

Con respecto a la eficiencia del tiempo de fermentación (24 a 48 h), observado en las muestras hidrolizadas (A), no se observan diferencias notables para todos los códigos. Si lo relacionamos con la cantidad de proteína soluble para cada código de muestra, no existe relación directa o inversa por lo que se descarta la posibilidad de que la variación de la cantidad de proteínas solubles en la muestra genere algún efecto de la capacidad quelante de los extractos peptídicos estudiados. Analizando estadísticamente la efectividad de los períodos de

fermentación (24 y 48 h) a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 15:

Ho: Todos los tratamientos poseen igual cantidad de Fe quelado (%) entre los períodos 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos tiene diferente cantidad de Fe quelado (%) entre los períodos 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

$$P \text{ valor} = 0.5304$$

Decisión: $P \text{ valor} > \alpha$, entonces se acepta Ho, siendo la prueba no significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se acepta Ho; por lo tanto, se puede afirmar que no existen diferencias en la cantidad de Fe quelado (%) entre los tratamientos para ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 16.

El número de comparaciones a realizar es 5.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa que todos los P valor de las comparaciones múltiples entre los promedios de los tratamientos son mayores al valor de significancia $\alpha=0.05$.

Como resultado final se tiene lo siguiente:

Las comparaciones entre los tratamientos A(24 h):BK vs A(48 h):BK, A(24 h):8 vs A(48 h):8, A(24 h):19 vs A(48 h):19, A(24 h):41 vs A(48 h):41 y A(24 h):42 vs A(48 h):42 no son significativos, por lo tanto, sus promedios son iguales.

Si analizamos estadísticamente la efectividad del etanol, evaluada en las muestras tipo S y P, a través de la prueba de Fisher para ver el efecto de los tratamientos, se tiene el siguiente desarrollo lo cual se encuentra procesado en el Anexo 13:

Ho: Todos los tratamientos poseen igual cantidad de Fe quelado (%) entre los tipos de fracciones A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

Ha: Alguno de los tratamientos poseen diferente cantidad de Fe quelado (%) entre los tipos de fracciones A, S, y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

$$\alpha = 0.05$$

$$P \text{ valor} = 0.0295$$

Decisión: $P \text{ valor} < \alpha$, entonces se rechaza Ho, siendo la prueba significativa.

Como resultado final se tiene lo siguiente: A un nivel de significancia del 5 %, se rechaza Ho; por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias en el efecto de actividad quelante entre los tratamientos para los tipos de fracción A, S y P en ambos períodos de 24 y 48 h.

A continuación, se presenta la prueba de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos cuyos resultados procesados se encuentran en el Anexo 14.

El número de comparaciones a realizar es 30.

$$H_0: \mu_k = \mu_m$$

$$H_a: \mu_k \neq \mu_m$$

Donde μ es el promedio poblacional, “k” y “m” son dos tratamientos en comparación.

$$\alpha = 0.05$$

Según la prueba Tukey, se observa lo siguiente:

Las comparaciones entre los promedios de los tratamientos BK:A (24 h) vs. BK:S (24 h), BK:A (24 h) vs. BK:P (24 h), BK:S (24 h) vs. BK:P (24 h), BK:A (48 h) vs. BK:P (48 h), 8:A (24 h) vs. 8:S (24 h), 8:A (24 h) vs. 8:P (24 h), 8:S (24 h) vs. 8:P (24 h), 8:A (48 h) vs. 8:S (48 h), 8:S (48 h) vs. 8:P (48 h), 19:A (48 h) vs. 19:S (48 h), 41:S (24 h) vs. 41:P (24 h), 41:A (48 h) vs. 41:S (48 h), 41:S (48 h) vs. 41:P (48 h), 42:A (24 h) vs. 42:S (24 h), 42:A (24 h) vs. 42:P (24 h), 42:S (24 h) vs. 42:P (24 h), 42:A (48 h) vs. 42:S (48 h) y 42:S (48 h) vs. 42:P (48 h) son diferentes, es decir hay diferencia significativa de la cantidad de Fe quelado (%) en los tratamientos por efecto del etanol.

Las comparaciones entre los promedios de los tratamientos BK:A (48 h) vs. BK:S (48 h), BK:S (48 h) vs. BK:P (48 h), 8:A (48 h) vs. 8:P (48 h), 19:A (24 h) vs. 19:S (24 h), 19:A (24 h) vs. 19:P (24 h), 19:S (24 h) vs. 19:P (24 h), 19:A (48 h) vs. 19:P (48 h), 19:S (48 h) vs. 19:P (48 h), 41:A (24 h) vs. 41:S (24 h), 41:A (24 h) vs. 41:P (24 h), 41:A (48 h) vs. 41:P (48 h) y 42:A

(48 h) vs. 42:P (48 h) son iguales, es decir no hay diferencia significativa de la cantidad de Fe quelado (%) en los tratamientos por efecto del etanol.

Los códigos de los extractos peptídicos que resultaron con mayor actividad quelante de Fe fueron 19(48h) S y 41(48h) P con un resultado de 84.21% y 84.03% respectivamente. Caso contrario, el código del extracto peptídico que resultó con menor capacidad quelante de Fe fue el 41(24h) S con un 5.20%.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la tabla 26, figura 12, demuestran la actividad quelante de hierro y guardan relación con los obtenidos por diversos autores. Así, ha sido referida la quelación de hierro y calcio en péptidos lácticos utilizando *Lactococcus lactis* (Figuroa-Hernández et al., 2012), en hidrolizados de caseinato ovino por acción de proteasas de *Bacillus sp* (Correa et al 2011), en hidrolizados de ovoalbúmina, caseína y leche utilizando proteasas de *Cynara scolymus L.*(alcachofa) (Bueno Gavilá, 2017); en hidrolizados de suero de calostro bovino obtenidos con pepsina y pancreatina (Fajardo et al., 2020), así como en hidrolizados de fuentes lácticas (Guo et al., 2014 y Fuentes-García, 2017).

Es interesante señalar que en estudios de péptidos lácticos quelantes de hierro, han sido reportados valores de 30% de hierro fijado a las 0 horas de fermentación (Figuroa- Hernández et al., 2012), valor que resulta cercano al obtenido en el presente estudio para las muestras BK (caseína control) de 32 %. En las muestras analizadas, los valores de Fe quelado llegan a 84.21 y 84.03 % (figura 12, tabla 26) superando los obtenidos por Figuroa-Hernández et al. (2012), y similares a los obtenidos por Correa et al. (2011) quien reportó 83.3 % en hidrolizados de caseinato de leche ovina utilizando enzimas microbianas de *Bacillus sp* durante 30 minutos de hidrólisis.

Correa et al. (2011) señalaron que el tiempo de hidrólisis en el proceso presenta una relación inversa con la capacidad de unión al Fe, es decir, la prolongación del tiempo de proteólisis disminuye la actividad quelante de minerales en las muestras estudiadas. Por ejemplo, como se mencionó en el párrafo anterior, los autores obtuvieron resultados de actividad quelante de Fe máximo de caseinato de leche ovina hidrolizado en 30 minutos, pero la prolongación del tiempo de hidrólisis disminuyó estos valores. En otro estudio realizado con suero de queso de

oveja para evaluar la actividad antioxidante y antihipertensiva, los autores analizaron la capacidad quelante de Fe obteniendo valores máximos luego de las 3 horas del proceso de hidrólisis, resultados que posteriormente mostraron notoria reducción (Córrea et al., 2014).

En la presente tesis, la prolongación de tiempo de fermentación de 24 a 48 horas no modificó la capacidad quelante de Fe en las muestras hidrolizadas (A) y el proceso se mantuvo estable; sin embargo, el efecto del etanol en la concentración de los péptidos, generó diferencias significativas para los extractos (S) de códigos 19 y 42, y extractos (P) de códigos BK y 8. Esto permite suponer; que en algunos casos, si bien el incremento del tiempo no produjo cambio alguno de la capacidad quelante, el etanol contribuyó a la formación de nuevas estructuras peptídicas favorables a la actividad quelante de Fe. Lo evidenciado podría no guardar relación con lo afirmado por los autores debido a diversos factores tales como, diferencia de sustratos, de proteasas, técnica de análisis, parámetros del proceso de hidrólisis, proceso de concentración con etanol, secuencia aminoacídica de los péptidos, entre otros. Por otro lado, Torres (2020) evaluó la capacidad antioxidante de fracciones peptídicas obtenidas de un tipo de queso añejo mexicano durante 0, 30, 95 y 180 días, obteniendo resultados máximos de capacidad quelante de Fe en ciertas fracciones a los 0, 95 y 180 días de maduración, por lo que no siempre se va cumplir la relación inversa entre el tiempo de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe.

Wu et al. (2017), identificando péptidos quelantes de Fe en gelatina de piel de bacalao (*Gadus morhua*), indicaron que la hidrólisis prolongada generó péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres. En el presente estudio, la prolongación del tiempo de hidrólisis (24 a 48 h) podría haber generado péptidos de bajo peso molecular por acción de las enzimas bacteriana sobre los enlaces peptídicos, aunque la actividad quelante de Fe en las muestras se mantuvo estable; sin embargo, el proceso adicional de concentración de péptidos con etanol hizo posible

el incremento de la actividad quelante de Fe en algunos extractos tipo S de muestras códigos 19 y 42, y extractos tipo P de muestras códigos BK y 8. Al respecto, se estima que el etanol podría provocar el incremento de actividad quelante de Fe en algunas muestras al actuar sobre los enlaces peptídicos de los aminoácidos. Asimismo, la solubilización o precipitación de extractos peptídicos en etanol, podría guardar relación con su afinidad en la conformación aminoacídica.

A partir de los hallazgos encontrados, aceptamos la hipótesis nula general que establece que se obtienen extractos peptídicos bioactivos con capacidad quelante de hierro a partir de hidrolizados de caseína utilizando bacterias proteolíticas aisladas de residuos de langostino.

VI. CONCLUSIONES

La acción de *Shewanella sp.* sobre los extractos peptídicos solubles en etanol (S) código 19 y los precipitados con etanol (P) código 41 durante 48 horas de hidrólisis, favorece la capacidad quelante de Fe por los péptidos generados: 84.21 % Fe quelado, 13.55 ug proteína soluble, 0.040 mg azocaseína hidrolizada, 17.76 % en muestra hidrolizada A (grado de hidrólisis) para el código 19 (48h) S. Y valores de 84.03 % Fe quelado, 14.89 ug proteína soluble, 0.043 mg azocaseína hidrolizada, 18.22 % en muestra hidrolizada A (grado de hidrólisis) para el código 41 (48h) P.

Con respecto al grado de hidrólisis (%), se concluye que las enzimas de la cepa de *Bacillus velezensis*, cuyo código es RL-15 (42), produjeron el mayor grado de hidrólisis con un valor de 20.02 %. Todas las enzimas de las 4 cepas en estudio produjeron mayor grado de hidrólisis frente a la muestra control (BK).

Con respecto a la actividad proteolítica, se concluye que las enzimas de la cepa de *Bacillus velezensis*, producto de la fermentación de 24 h, fueron capaces de hidrolizar la mayor cantidad de azocaseína con un valor de 0.166 mg az. La fermentación de 24 a 48 h, generó una notable disminución de actividad proteolítica en las enzimas de la cepa en mención, con un valor de 0.166 a 0.061 mg az. El empleo del etanol produjo una alta cantidad de azocaseína hidrolizada con un valor de 0.140 mg az. en extractos peptídicos precipitados con etanol (P) generado por las enzimas de la misma cepa en mención con 24 h de fermentación. El empleo del etanol produjo una alta cantidad de azocaseína hidrolizada con un valor de 0.083 mg az. en extractos peptídicos solubles en etanol (S) por las enzimas de la cepa *Shewanella sp.* con 24 h de fermentación.

Se concluye que el tiempo de fermentación (24 a 48 h) de las cepas en estudio no produjo un cambio notable de la cantidad de proteínas solubles evaluada en las muestras hidrolizadas

(A). Sin embargo, el empleo del etanol hizo posible un notable incremento y disminución de proteínas solubles evaluadas en muestras tipo S y P.

Con respecto al patrón EDTA, las muestras hidrolizadas(A) BK (48h) A (caseína control), 19(48h) A y 8(24h) A presentaron mayor actividad quelante de hierro. Similar comportamiento fue observado en extractos peptídicos solubles en etanol (S), las muestras (BK (24h) S, BK (48h) S, 19(24h) S, 19(48h) S). Todos los extractos peptídicos precipitados con etanol (P), también mostraron mayor actividad quelante de hierro con respecto al patrón utilizado.

Los resultados indican que no existe efecto significativo en la prolongación del tiempo de fermentación evaluado en las muestras hidrolizadas (A) respecto a su capacidad quelante de Fe; sin embargo, la concentración de péptidos utilizando etanol demostró incrementar esta acción, lo cual sugiere la ruptura y formación de secuencias peptídicas que favorecen la quelación de Fe.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren importantes aplicaciones en el campo de la salud y la nutrición en base a péptidos bioactivos hidrolizados por bacterias proteolíticas aisladas de residuos industriales de langostinos.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar otros procedimientos de concentración y/o purificación de péptidos que busquen mejorar su capacidad quelante.

Profundizar en el estudio de las estructuras y secuencias aminoacídicas de los péptidos bioactivos y utilizar enzimas procedentes de microorganismos proteolíticos marinos, contribuiría al diseño de procesos de elevada eficiencia.

El complemento de resultados in vitro tal como los desarrollados en el presente estudio, con pruebas in vivo para evaluar la biodisponibilidad de Fe y de otros micronutrientes en el organismo significaría una importante contribución en el campo de la alimentación y la salud humana.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A. & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *Int. Dairy J.*, 66, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.006>
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., García, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A., & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>
- Ait-Oukhatar, N, Peres, J., Bouhallab, S., Neuville, D., Bureau, F., Bouvard, G., Arhan, P., & Bougle, D. (2002) Bioavailability of caseinophosphopeptide-bound iron. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Elsevier*, 140 (4), pp.290-294. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01568870/document>
- Aît-Oukhatar, N., Bouhallab, S., Arhan, P., Maubois, J. L., Drosdowsky, M., & Bouglé, D. (1999). Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of beta-casein. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 47(7), 2786–2790. <https://doi.org/10.1021/jf981018k>
- Aktnis, P. y Jones, L. (2012). *Principios de química: Los caminos del descubrimiento* (J. Hernandez, Trad.; 5.^a ed.). Editorial medica panamericana. (Trabajo original publicado en 2011)
- Ambriz, D., Fuentes, C., Germán, L., Medina, S., y Valdez, A. (s.f.). Potencial antihipertensivo y

- antioxidante de hidrolizados proteínicos de garbanzo (*Cicer arietinum L.*) cv. Blanco Sinaloa 92.
<https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/I/carteles/CI-51.pdf>
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones*. Zaragoza: Acribia
- Alais, Ch. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Editorial Reverté, S.A. España.
- Alenezi, F. N., Slama, H. B., Bouket, A. C., Cherif-Silini, H., Silini, A., Luptakova, L., Nowakowska, J. A., Oszako, T., & Belbahri, L. (2021). *Bacillus velezensis: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal, Biocontrol and Environmental Importance*. *Forests*, 12(12), 1714. <https://doi.org/10.3390/f12121714>
- Arango, A., Vélez, C., Jaramillo, Y., Valencia, M., y Hernandez, A. (2012). Cuantificación de hierro ferroso en espinaca y harina fortificada: una aplicación para la industria de panificación. *Journal of engineering and technology*, 1(1), 26-33.
<http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/699/1/202-426-1PB.pdf>
- Arauco P., K., Woolcott H., J. C., León Q., J., Galarreta, H., y Sánchez R., T. (2004). Optimización de parámetros cinéticos de bacterias proteolíticas aisladas de ambientes marinos contaminados. *Revista Peruana De Química E Ingeniería Química*, 7(1), 56–62.
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4699>
- Arellano R. (2017). *Los seis Estilos de Vida*. <https://www.arellano.pe/los-seis-estilos-de-vida/> Association of Official Analytical Chemistry AOAC, O. M. (s.f.). Method AOAC 944.02.

- Aslim, B.; Sağlam, N.; and Beyatli, Y. (2002). Determination of Some Properties of Bacillus Isolated from Soil. *Turkish Journal of Biology* , 26 (1), 41-48.
<https://journals.tubitak.gov.tr/cgi/viewcontent.cgi?article=2237&context=biology>
- Atienzar, C. (2019). Microorganismos marinos en la producción de corriente eléctrica. Celdas de combustible y posibles aplicaciones en generadores de corriente. [Trabajo de grado, Universitat d'Alacant]. Archivo digital.
https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/107559/1/Microorganismos_marinos_en_la_produccion_de_corr_Atienzar_Fernandez_Cristina.pdf
- Baakdah, M. M., & Tsopmo, A. (2016). Identification of peptides, metal binding and lipid peroxidation activities of HPLC fractions of hydrolyzed oat bran proteins. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3593–3601. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2341-6>
- Badui, S. (2006). Vitaminas y nutrimentos inorgánicos. En S. Badui. (Ed.), *Química de los alimentos* (pp. 301-362). Pearson Educación.
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro- Badui2006_26571.pdf
- Bao, X.-L., Lv, Y., Yang, B.-C., Ren, C.-G. & Guo, S.-T. (2008). A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, 73, 117–121. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00673.x>
- Baró, L., Jimenez, J., Martinez-Férez, A. y Bouza, JJ. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42 (3-4), 135-145.
<https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5691/13198>
- Bergheim, A., Bekkevold, S., & Bergslien, H. (2000, octubre). Utilisation of by-products from

- Norwegian aquaculture and fisheries [conferencia]. The 3rd World Fisheries Congress, Beijing, China.
https://www.researchgate.net/publication/316967997_Utilisation_of_byproducts_from_Norwegian_aquaculture_and_fisheries
- Belagardi, M. (2011). *Obtención de hidrolizados protéicos a partir de cebada agotada* [Tesis de grado, Universidad Fasta]. Archivo digital.
http://redi.ufasta.edu.ar:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/306/2011_n_030.pdf?sequence=1
- Baptista JP, Sanches PP, Teixeira GM, Morey AT, Tavares ER, Yamada-Ogatta SF, da Rocha SPD, Hungria M, Ribeiro RA, Balbi-Peña MI, Chideroli RT, Pereira UDP, de Oliveira AG. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal plant pathogens. *Genome Announc*, 6 (25).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00595-18>.
- Barrero, J.A.; C. M. Cruz; J. Casallas; J. S. Vásquez (2021). Evaluación in sílico de péptidos bioactivos derivados de la digestión de proteínas presentes en la leche de bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*), *TecnoLógicas*, 24 (50), e1731. <https://doi.org/10.22430/22565337.1731>
- Beaulieu, L.; Thibodeau, J.; Bonnet, C.; Bryl, P.; Carbonneau, M. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1(4), 149–157.
- Becerra, S. y Paz, J. (2009). *Uso de caseína como film comestible*. *NutraDesign*.
https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/100206/0520_aqbecerra_s.pdf?sequence

e=3

&isAllowed=y

Belitz, H-D; & Grosch, W. (1997). Química de los alimentos (2.^a ed.). Acribia

Belchior, E. (2005). Actividad proteolítica de bacteria psicrotrofas y/o psicrofilas aisladas de muestras de merluza (*Merluccius hubbsi*). *Naturalia Patagónica*, 2(1), 130-134.
[http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/naturalia/coleccion/Naturalia%20Patag%C3%B3nica%20Vol%202%20\(1\)%202005.pdf#page=139](http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/naturalia/coleccion/Naturalia%20Patag%C3%B3nica%20Vol%202%20(1)%202005.pdf#page=139)

Benítez, R., Ibarz, A y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42 (2), 227-236.
<https://www.redalyc.org/pdf/535/53542208.pdf>

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 498–508.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.004>

Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K., Duggal, A., & Dey, K. & Pandey, A. (2013). Industrial enzymes - Present status and future perspectives for India. *J Sci. Ind. Res.* 72(5), 271-286.
https://www.researchgate.net/publication/259478803_Industrial_Enzymes_-_Present_Status_Future_Perspectives_for_India

Borja Lozano, Y. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* (“tarwi”) mediante proteasas de *Bacillus sp.* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Cybertesis. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3924>

- Bredholt H, Fjaervik E, Jhonsen G y Zotechev SB. (2008). Actinomicetos de sedimentos en Trondheen Fjord, Noruega: diversidad y actividad biológica. *J Mar Drogas*, 6 (1), 12-24. <https://doi.org/10.3390/md6010012>
- Buchanan, J., Sarac, H. Z., Poppi, D., & Cowan, R. T. (1997). Effects of enzyme addition to canolameal in prawn diets. *Aquaculture*, 151(1), 29-35.
- Bueno, E. (2017). Utilización de proteasas de *Cynara scolymus L.* para la obtención de péptidos bioactivos a partir de ovoalbúmina, caseína y leche. [Tesis doctoral, Universidad Católica de Murcia]. Archivo digital. <https://core.ac.uk/download/pdf/159419631.pdf>
- Buleje, V. (2017). *Obtención de cepas bacterianas productoras de enzimas de interés industrial a partir de residuos de langostino (Litopenaeus vannamei, Boone, 1931)* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]
- Butnariu, M. & Sarac, I. (2019). Functional Food. *International Journal of Nutrition*, 3(3), 7-16. <https://dx.doi.org/10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-2615>
- Boutrou, R., Coirre, E., Jardin, J., Léonil, J. (2010). Phosphorylation and coordination bond of mineral inhibit the hydrolysis of the β -casein (1-25) peptide by intestinal brush-border membrane enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(13), 7955-7961. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf100568r>
- Cardero, Y., Sarmiento, R., y Selva, A. (2009). Importancia del consumo de hierro y vitamina C para la prevención de anemia ferropénica. *MEDISAN*, 13(6). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192009000600014&lng=es&tlng=es.

- Centro Nacional para la Información Biotecnológica-NCBI (2020). Taxonomía Browser. Base de datos. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Cheffi, M.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Belka, M.; Vallat, A.; Rateb, M.E.; Tounsi, S.; Triki, M.A.; Belbahri, L. (2019). *Olea europaea* L. Root Endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 Counteracts Oomycete and Fungal Harmful Pathogens and Harbours a Large Repertoire of Secreted and Volatile Metabolites and Beneficial Functional Genes. *Microorganisms*, 7, 314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>
- Chiangjong, W., Chutipongtanate, S., & Hongeng, S. (2020). Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *International Journal of Oncology*, 57, 678-696. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5099>
- Cisneros Yupanqui, M. (2017). Purificación de péptidos bioactivos de quinua (*Chenopodium quinoa*) con actividad antioxidante y antihipertensiva [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Biblioteca Agrícola Nacional (BAN). <https://hdl.handle.net/20.500.12996/2880>
- Cid, C. (2004). Proteína Total, Calcio, Fósforo y Estabilidad Térmica de la leche y su Relación con las Variantes Genéticas de k-Caseína-Época de Invierno. [Tesis de pregrado, Universidad Austral de Chile]. Archivo digital. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fac568p/doc/fac568p.pdf>
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 254–262. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3)
- Copa, J., Solivery, J. & Caballero, A. (2006). Utilización de felúrico esterasa en masas de harina

- detrigo. P200302033. España.
- Corréa, A., Daroit, D., Coelho, J. , Meira, E. , Lopes, L. , Segalin, J. , Risso, R. & Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247-2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Corréa, A.; Daroit, D.; Fontoura, R.; Meira, S.; Segalin, J.; Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61(), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>
- CORDIS (2019). Industrial Applications of Marine Enzymes: Innovative screening and expression platforms to discover and use the functional protein diversity from the sea. <https://cordis.europa.eu/article/id/286065-tough-marinesourced-enzymes-ready-to-shake-up-industry/es>
- Cortés-Sánchez, A., Díaz-Ramírez, M., Salgado-Cruz, M. (2017). *Bacillus cereus*: Alimentos, Salud y Biotecnología. *Agroproductividad*, 10 (10), 3-9. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1122/1/PUB-ARTICULO-3995.PDF>
- Coultate, T.P. (1998). Manual de química y bioquímica de los alimentos (2.^a ed.). Acribia
- Cruz, E. (2016). Obtención de péptidos alimentarios mediante hidrólisis enzimática con efectos sobre la salud intestinal. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Archivo digital. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/152191/1/tesispeptidosalud.pdf>

- Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32.
<https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En O. Fennema (Ed.), *Química de los alimentos de Fennema* (pp. 179-262). Artmed
- De Oliveira, C., Corrêa, A., Coletto, D., Daroit, D., Cladera, F. & Brandelli, A. (2014). Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2668–2678.
<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1317-7>
- Demers-Mathieu, V.; Gauthier, S.; Britten, M.; Fliss, I.; Robitaille, G.; Jean, J. (2013). *Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration.* , 28(2), 94-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.003>
- Delgado, O., Añón, M., y Tironi, V. (2016). Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad. *INNOTEC*, 11, 18-26.
<https://www.redalyc.org/journal/6061/606163573007/606163573007.pdf>
- Donato, H. (2017). Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr*, 115(4), 406-408.
<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2017.s68>
- Donida, B., Mrak, E., Gravaghi, C., Villa, I., Cosentino, S., Zacchi, E., Perego, S., Rubinacci, A., Fiorilli, A., Tettamanti, G. & Ferraretto, A. (2009). Casein phosphopeptides promote calciumuptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. *Peptides*, 30(12), 2233–2241.

- Drago, S., Luggren, P., Vioque, J., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L. y Gonzáles, R. (2013). Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo. En M. Segura Cgampos, L. Chel Guerrero y D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 83-109). Barcelona: OmniaScience.
- Du, Y., Esfandi, R., Willmore, W.G. & Tsopmo, A. (2016). Antioxidant activity of oat proteins derived peptides in stressed hepatic HepG2 cells. *Antioxidants (Basel)*, 5, 39. <https://doi.org/10.3390/antiox5040039>
- Durán, E., Villalobos, C., Churio, O., Pizarro, F., y Valenzuela, C. (2017). Encapsulación de hierro: Otra estrategia para la prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. *Revista chilena de nutrición*, 44(3), 234-243. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000300234>
- Dumay, J.; Barthomeuf, C.; Berge, J. P. (2004). How Enzymes May Be Helpful for Upgrading Fish By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2), 69–84. https://doi.org/10.1300/J030v13n02_07
- Ebrahimabadi, A.; Ebrahimabadi, E.; Djafari-Bidgoli, Z.; Kashi, F.; Mazoochi, A.; Batooli, H. (2010). Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. , 119(2), 452–458.
- Eckert, E., Bamdad, F. & Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chem*, 159, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.061>
- Ennaas, Nadia; Hammami, Riadh; Beaulieu, Lucie; Fliss, Ismail (2015). Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic

- mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3), 195-200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.091>
- Essuman, E., Nagajyothi, P. & Tettey, C. (2017). Antioxidant, Ferric Iron Chelation and Antimicrobial Activities of Extracts of *Pseudocydonia sinensis* (Chinese Quince) Fruit. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(5), 175-179. https://www.researchgate.net/publication/320508213_Antioxidant_Ferric_Iron_Chelation_and_Antimicrobial_Activities_of_Extracts_of_Pseudocydonia_sinensis_Chinese_Quince_Fruit
- Fajardo-Espinosa, F.S., Romero-Rojas, A. y Hernández-Sánchez, H. (2020). Producción de péptidos bioactivos a partir de suero de calostro bovino por hidrólisis enzimática. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19 (1), 1-9. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim525>
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- Feller, G.; E. Narinx, J. A. Arpingny, M. Haleb, E. Baise, S. Genicot and Ch. Gerday. 1996. Enzymes from psychrophilic organism. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 189-202. https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/16252/1/CMLS_97_review.pdf
- Ferrandini, E.; Castillo, M.; López, M.B. y Laencina, J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 22, 5-18. <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/771/799>
- Figueroa-Hernández, C; Cruz-Guerreo, A.; Rodríguez-Serrano, G.; Gómez-Ruiz, L.; García-Garibay, M. y Jiménez-Guzmán, J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y

- hierro por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 259-267. <http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1559/727>
- Food Insight (2016, 9 de febrero). *What is a "Superfood"?* [Video]. Youtube. https://www.youtube.com/watch?v=F86GFEM_4eI
- Foong, L., Imam, M. & Ismail, M. (2015). Iron-Binding Capacity of Defatted Rice Bran Hydrolysate and Bioavailability of Iron in Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9029-9036. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03420>
- Fuentes-García, P. (2017). Péptidos bioactivos derivados de la leche de bovino y sus efectos fisiológicos en humanos: generalidades y aspectos moleculares. Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. https://www.researchgate.net/profile/Paula-FuentesGarcia/publication/320944929_PEPTIDOS_BIOACTIVOS_DERIVADOS_DE_LA_LECHE_DE_BOVINO_Y_SUS_EFECTOS_FISIOLOGICOS_EN_HUMANOS_GENERALIDADES_Y_ASPECTOS_MOLECULARES/links/5a03d5034585151f478eb624/PEPTIDOS-BIOACTIVOS-DERIVADOS-DE-LA-LECHE-DE-BOVINO-Y-SUS-EFECTOS-FISIOLOGICOS-EN-HUMANOS-GENERALIDADES-Y-ASPECTOS-MOLECULARES.pdf
- Fullana, N. (2014). Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. [Tesis de maestría, UdelaR]. Archivo digital. <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/08/Producci%C3%B3n-y-caracterizaci%C3%B3n-parcial-de-una-proteasa-bacteriana-activa-a-baja-temperatura-2014-ilovepdf-compressed.pdf>
- Gharaei-Fathabad E. 2011. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 58-69.

<https://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ajdd/2011/58-69.pdf>

Galazzi, E., Gallo, A., y Torres, M. (2018). Obtención de hidrolizados y péptidos con actividad antioxidante a partir de proteínas de chía (*Salvia hispanica L*). Universidad Nacional de Cuyo. http://tesisfcp.bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13314/27-agroalimentos-galazzi-eugenia-unnoba.pdf

Gallegos, S. (2012). Actividad antioxidante y quelante de los productos de hidrólisis de proteínas de *Jatropha curcas L*. [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional]. Archivo digital. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/7666?mode=full>

Gálvez, A., Flores, I., y González, A. (2006). Proteínas. En S. Badui. (Ed.), *Química de los alimentos* (pp. 119-244). Pearson Educación. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf

García, C.A.C.; Montiel, R.L.A. y Borderas, T.F. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Archivos Zootécnicos*, 63(R), 85-105. https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cj_SiWk3cjwJ:https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/download/592/566&cd=3&hl=es&ct=clnk&gl=pe

García-Castro, A., Roman-Gutierrez, A. D., Guzmán-Ortiz, F. A., Castañeda-Ovando, A., & Cariño-Cortés, R. (2022). Compuestos bioactivos presentes en alimentos con actividad antihipertensiva y su efecto en COVID-19. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 9(18), 1-6. <https://doi.org/10.29057/icbi.v9i18.8098>

García-Guerrero, Marcelo U, Becerril-Morales, Felipe, Vega-Villasante, Fernando, & Espinosa-Chaurand, Luis Daniel. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico

- y conservación. *Latin american journal of aquatic research*, 41(4), 651-675.
<https://dx.doi.org/103856/vol41-issue4-fulltext-3>
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martinez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464–472.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.087>
- Gebreyohannes, E. A., Bhagavathula, A. S., Abebe, T. B., Tefera, Y. G., & Abegaz, T. M. (2019). Adverse effects and non-adherence to antihypertensive medications in University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital. *Clinical hypertension*, 25, 1.
<https://doi.org/10.1186/s40885-018-0104-6>
- Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. (2015). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2617–2627.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.903384>
- Glazer, A. (1998). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. Editorial WH Freeman and company. Estados Unidos. 249-256.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242, 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.035>
- Guo, L., Harnedy, P. A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., & FitzGerald, R. J. (2014). Food

- protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 92–105.
- Guadix, A., Guadix, E., Paez-Dueñas, M. y Gonzales-Tello, P. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1), 78-89. <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5735/13245>
- Haki, G. D. & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: areview. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Hau, H. and Gralnick, J. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61 (1), 237-258. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- Hafeez, Zeeshan; Cakir-Kiefer, Céline; Girardet, Jean-Michel; Jardin, Julien; Perrin, Clarisse; Dary, Annie; Miclo, Laurent (2013). Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9787–9799. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5245-7>
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Péptidos derivados de alimentos con actividad biológica: de la investigación a las aplicaciones alimentarias. *Opinión actual en biotecnología*, 18(2), 163–169.
- Harnedy, PA, O'Keeffe, MB y FitzGerald, RJ (2015). Purificación e identificación de péptidos inhibidores de dipeptidil peptidasa (DPP) IV de la macroalga *Palmaria palmata*. *Química delos alimentos*, 172, 400–406.

- Hau, H. & Gralnick, J. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 237-258. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 588– 593. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Hernández-Ledesma, B. (2002). *Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Archivo digital. <http://hdl.handle.net/10261/101499>
- Herrera, L. (2015). Microorganismos productores de enzimas hidrolíticas provenientes del oligoqueto antártico, *Grania sp.* [Tesina de pregrado, Universidad de la Republica de Uruguay]. Archivo digital. <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/11/Herrera-2015.pdf>
- Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M., & Hutcheson, S. W. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 627-635.
- Hunt, J. R., & Roughead, Z. K. (2000). Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 71(1), 94–102. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.94>
- Huang, S., Chen, K., Chen, Y., Hong, W. & Chen, M. (2010). Immunomodulatory properties of

- the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(5), 1061–1067. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02239.x>
- Iavarone, F., Desiderio, C., Vitali, A., Messana, I., Martelli, C., Castagnola, M., & Cabras, T. (2018). Cryptides: latent peptides everywhere. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(3), 246–263. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1447543>
- Ibrahim, A. S. S., Al-Salamah, A. A., Elbadawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., & Ibrahim, S. S. S. (2015). Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 236–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.04.001>
- International Life Sciences Institute (ILSI Europe) (1999). FUFLOSE : scientific concepts of functionalfoods in Europe. Consensus Document. *Br J Nutr*, 81, 1-27.
- ITP & IMARPE. 1996. *Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas del Perú*. <https://repositorio.imarpe.gob.pe/handle/20.500.12958/1387>
- Ivanova, E. P. (2004). Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(5), 1773–1788. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02997-0>
- Jacques, P. (2011). Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. En: Soberón-Chávez, G.

- (eds) Biosurfactants. Microbiology Monographs, vol 20.
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14490-5_3
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.
- Jaiswal, A; Bajaj, R.; Mann, B. & Lata, K. (2015). Iron (II)-chelating activity of buffalo α S-caseinhydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3911-3918. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-014-1626-x>
- Janda, J. & Abbott, Sh. (2014). The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(4), 293-312.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.726209>
- Jha, RK y Zi-rong, X. (2004). Compuestos biomédicos de organismos marinos. *Medicamentos marinos*, 2 (3), 123–146.
- Jørgensen, B. R., & Huss, H. H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology*, 9(1), 51–62.
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90037-8)
- Justo, S., Churasacari, T., Saldaña, C., Cajachagua, C., Pabón, L., Gónzales, M., Santiago, D. y Guerra, A. (2014). Determinación de Géneros Bacterianos en el Mar de la Playa Cantolao –La Punta – Callao. *Revista de Ciencias*, 10 , 119-126.
- Kayode-Isola, T., Eniola, K., Olayemi, A., & Igunnugbemi, O. (2008). Response of resident bacteria of a crude oil-polluted river to diesel oil. *Am.-Eurasian J. Agro.*, 1 (1), 6-9.
https://www.researchgate.net/publication/242227491_Response_of_Resident_Bacteria_of

_a_Crude_Oil-Polluted_River_to_Diesel_Oil

- Kibangou, I.B., Bouhallab, S., Henry, G., Bureau, F., Allouche, S., Blais, A., Guerin, P., Arhan, P., Bougle, D.L. (2005). Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatric Research*, 58(4), 731-734.
<https://europepmc.org/article/med/16189201>
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 138–145. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20134245/>
- Kitts, D.D. & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.*, 9, 1309-1323.
<https://doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Koch, K. y Vasek, O. (2014). Capacidad remineralizante de péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas. *Revista FOUNT*, 32, 21-23.
https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/33839/RIUNNE_FACENA_AR_Koch-Vasek.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
<https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
- Koster M, Bitter W, Tommassen, J. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol*, 290(4-5):325-31. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80033-8](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80033-8)

Kramm, J. (2003). Composición Proteica y su Relación con las Variantes Genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina en Leche de Vacas Frisón Negro. [Tesis de pregrado, Universidad Austral de Chile]. Archivo digital. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fak.89c/doc/fak.89c.pdf>

Kristinsson, H. & Rasco, B. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

Kumar, Devendra; Chatli, Manish Kumar; Singh, Raghvendar; Mehta, Nitin; Kumar, Pavan (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139(), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>

Langley, A. K., Suffoletta, T. J., & Jennings, H. R. (2007). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and the incretin system in type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*, 27(8), 1163–1180. <https://doi.org/10.1592/phco.27.8.1163>

Leal, M; Guagliano, M. y Sánchez, A. (2016). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: Alimentos funcionales. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/est_agr_estudio-panoramico-alimentos-funcionales_0.pdf

Lee, H. H., Park, J., Lim, J. Y., Kim, H., Choi, G. J., Kim, J. C., & Seo, Y. S. (2015). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* G341, a strain with a broad inhibitory spectrum against plant pathogens. *Journal of biotechnology*, 211, 97–98.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.07.005>

- León, J., Aponte, J.J., Cuadra, D' Lourdes, Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M., & Marguet, E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de biología marina y oceanografía*, 51(1), 69-80. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-19572016000100007&script=sci_arttext&tlng=pt
- León, J., Pellón, F., Unda, V., David, J., Anaya, C., y Mendoza, V. (2000). Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Revista Peruana De Biología*, 7(2), 202–210. <https://doi.org/10.15381/rpb.v7i2.6828>
- León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M., y Orosco, A. (2010). Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, 27(2), 215-221. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S17264634201000020009
- León, J. y García, P. (1998). Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Revista Peruana de Biología*, 5(1). https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v05_n1/cepas_nati.htm
- León, J. (1996). Cepas nativas del bacterioneuston marino con actividad antagónica frente a bacterias ictiopatógenas. Caracterización preliminar de sustancias inhibitorias [Tesis de maestría, Universidad Católica de Valparaíso].
- Li, S., Niu, Y., Chen, H., & He, P. (2020). Complete genome sequence of an Arctic Ocean bacterium *Shewanella* sp. Arc9-LZ with capacity of synthesizing silver nanoparticles in darkness. *Marine Genomics*, 100808. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100808>

- Lentini, V., Gugliandolo, C. & Maugeri, TL. (2007). Identificación de bacilos termofílicos productores de enzimas aislados de respiraderos marinos de las Islas Eolias (Italia). *Ana. Microbiol.* 57, 355–361. <https://doi.org/10.1007/BF03175073>
- Lombardi, J. (2018) Innovación en la elaboración de productos lácteos utilizando peptidasas de origen microbiano [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Rosario]. Archivo digital. <http://biblioteca.puntoedu.edu.ar/handle/2133/16021>
- López-Expósito, I. & Recio, I. (2008). Protective Effect of Milk Peptides: Antibacterial and Antitumor Properties. *Bioactive Components of Milk*, 271–294. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_11
- Loveday, S. (2019). Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 22.1- 22.29. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128>
- Lovrien, R. & Matulis, D. (1995). Assays for total protein. En J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield and H. L. Ploegh (Eds.). *Current Protocols in Protein Science* (pp.275-298). Gwen Taylor
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lozoff, B., Beard, J., Connor, J., Felt, B., Georgieff, M. & Schallert, T. (2006). Long-Lasting Neural and Behavioral Effects of Iron Deficiency in Infancy. *Nutrition Reviews*, 64(5), 34-43. <https://doi.org/10.1301/nr.2006.may.s34-s43>

- Luévanos-Escareño¹, M., Vázquez-Vuelvas, O., Balagurusamy, N., Romero-Cedillo, L. y Loera, P. (2014). Biocatalizadores: desarrollo tecnológico de enzimas con beneficios a gran escala. En M. Cueto, N. Margarita de la Fuente y M. Luévanos Escareño. (Ed.). *Fronteras en Microbiología Aplicada* (pp. 73-125). Universidad Autónoma de Coahuila. <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/libros/2014/3.-%202014Fronteras%20en%20microbiologia.pdf#page=73>
- Mada, S., Ugwu, Ch. & Abarshi, M. (2019). Health Promoting Effects of Food-Derived Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09890-8>
- Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H. J., León-Galván, F., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., González de Mejía, E. O. de Lumen, B. & Barba de la Rosa, A. P. (2010). Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen- induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*, 31(9), 1635–1642. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.014>
- Mandal, M. D., Mandal, S., & Pal, N. K. (2005). Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish *Labeo rohita*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2005(3), 280–286. <https://doi.org/10.1155/JBB.2005.280>
- Mandragutti, T., Dokka, M., Panchagnula, B. & Godi, S. (2021). Molecular characterization of marine bacterial isolates of Visakhapatnam coast-efficacy in dye decolorization and bioremediation of cadmium. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 87. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00189-0>
- Martínez, A. (2017). Digestión gastrointestinal in vitro de proteínas de amaranto: liberación de

- péptidos multifuncionales. [Tesis de posgrado, Universidad Autónoma de Madrid]. DIGITAL.CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/196133>
- Maza, M. y Legorreta, P. (2011). Generalidades de la leche y los productos lácteos. En B. Colonia.(Ed.), *El libro blanco de la leche y los productos lácteos* (pp. 26-43). Canilec.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J.(2007). Affinity Purification of Copper Chelating Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3949–3954. <https://doi.org/10.1021/jf063401s>
- Mellander, O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 55(5-6), 247-255.
- Mena, M. (2021, 12 de noviembre). *537 millones de adultos viven con diabetes en el mundo, cifra que va en aumento*. Statista. <https://es.statista.com/grafico/6698/la-expansion-de-ladiabetes/#:~:text=Seg%C3%BAAn%20la%20Federaci%C3%B3n%20Internacional%20de,en%20este%20grupo%20de%20edad.https://es.statista.com/grafico/6698/la-expansion-de-ladiabetes/#:~:text=Seg%C3%BAAn%20la%20Federaci%C3%B3n%20Internacional%20de,en%20este%20grupo%20de%20edad>.
- Mendoza-Jiménez, Y., Eusebio-Moreno, J., Álvarez-García, R., Abreu-Corona, A., Vargas-Hernández, G., Téllez-Jurado, A., y Tovar-Jiménez, X. (2018). Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cv negro primavera-28 y flor de durazno. *Biotecnia: Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 20(2), 25-30.

<http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/425/1/Actividad%20antioxidante.pdf>

Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., & Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews*, 27(02), 308–329. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000225>

Miranda, C. A., Martins, O. B., & Clementino, M. M. (2008). Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9204-0>

Miravet, M., Enríquez, D., Lugioyo, G., Delgado, Y., Núñez, R., Cabrera, H. y Martí, J. (2003). Primeros registros de bacterias marinas heterótrofas y hongos aislados de los arrecifes que bordean la plataforma SW de Cuba. *Serie Oceanológica*, 1, 68-75. <https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/3331/articulo18.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mollet, B., & Rowland, I. (2002). Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 483–485. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00375-0](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00375-0)

Montesano, D., Gallo, M., Blasi, F., & Cossignani, L. (2020). Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences. *Current Opinion in Food Science*, 31, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.008>

Mora, L., & Hayes, M. (2015). Cardioprotective Cryptides Derived from Fish and Other Food Sources: Generation, Application, and Future Markets. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 63(5), 1319–1331. <https://doi.org/10.1021/jf505019z>
- Mukai, H., Hokari, Y., Seki, T., Takao, T., Kubota, M., Matsuo, Y., Tsukagoshi, H., Kato, M., Kimura, H., Shimonishi, Y., Kiso, Y., Nishi, Y., Wakamatsu, K. & Munekata, E. (2008). Discovery of Mitocryptide-1, a Neutrophil-activating Cryptide from Healthy Porcine Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30596–30605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803913200>
- Müller-Sterl, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* (J. Centelles, Trad.). Editorial Reverté. (Trabajo original publicado en 2004)
- Nagai, R. & Taniguchi, N. (2019). Aminoácidos y proteínas. En J. Baynes & M. Dominiczak. (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 7-23). Elsevier.
- Nasri, M. (2017). Protein Hydrolysates and Biopeptides. *Advances in Food and Nutrition Research*, 109–159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Natural Institutes of Health [NIH] (2022, 5 de abril). Datos sobre el hierro. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Iron-DatosEnEspañol.pdf>
- Nauck M. A. (2011). Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *The American journal of medicine*, 124(1 Suppl), S3–S18. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.11.002>
- Navarro, A., García, L. y Sánchez-Rojas. (1972). Aspectos del proceso hidrolítico ácido de proteínas. *Anales de la Universidad de Murcia*, 121-129. <https://revistas.um.es/analesumciencias/article/download/102701/97671>
- Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N. & Berdutina, A. V. (2000). Properties and uses of protein

- hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452-459.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 26–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.022>
- Nongonierma, A.B. & FitzGerald, R.J. Investigation of the Potential of Hemp, Pea, Rice and Soy Protein Hydrolysates as a Source of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. *Food Dig. Res Curr Opin* 6, 19–29 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13228-015-0039-2>
- Ochoa, K. (2018). Purificación de péptidos de un hidrolizado proteico de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen): Con actividad antioxidante y antihipertensiva. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Archivo digital. <https://library.co/title/purificacion-de-peptidos-de-un-hidrolizado-proteico-de-canihua-chenopodium-pallidicaule-aellen-con-actividad-antioxidante-y-antihipertensiva>
- Oliva, Y. y Vega, S. (2004). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales. *Rev. Salud Anim.*, 26 (3), 151-162. <https://biopeptide.es/wp-content/uploads/2017/11/P%C3%89PTIDOS-BIOACTIVOS-DERIVADOS-DE-LAS-PROTE%C3%8DNAS-L%C3%81CTEAS-2004.pdf>
- Orosco Condorí E. (2013). Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos. Trabajo final de grado. FCE, UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/34208>.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2020, 20 de abril). Las nuevas orientaciones de la OMS ayudan a detectar la carencia de hierro y a proteger el desarrollo cerebral.

<https://www.who.int/es/news/item/20-04-2020-who-guidance-helps-detect-iron-deficiency-and-protect-brain-development>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2021, 25 de agosto). Más de 700 millones de personas con hipertensión sin tratar. <https://www.who.int/es/news/item/25-08-2021-more-than-700-million-people-with-untreated-hypertension>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2022, 02 de febrero). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20la%20principal,colon%0y%20recto%20y%20pr%C3%B3stata.>

Ostos, O., Rosas, S. y Gonzales, J. (2018). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, 17(31), 129-163. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/950/1368>

Owen, R. J., Legors, R. M., & Lapage, S. P. (1978). Base composition, size and sequence similarities of genoma deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens*. *Journal of general microbiology*, 104(1), 127-138. <https://doi.org/10.1099/00221287-104-1-127>

Pariona, F. (2014). Análisis comparativo del método formol de Walker y el método de Biuret, en la determinación de la concentración de caseína en la leche fresca [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Archivo digital. http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/933/1/Tesis%20AI144_Par.pdf

Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 831–840.

<https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>

Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Klauser, S.; Hunziker, P.; Von Fellenberg, R. (1997).

Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. ,
82(3),372–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00372.x>

Pepe, G., Tenore, G. C., Mastrocinque, R., Stusio, P., & Campiglia, P. (2013). Potential

Anticarcinogenic Peptides from Bovine Milk. *Journal of Amino Acids*, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2013/939804>

Pérès, J., Bouhallab, S., Bureau, F., Maubois, J., Arhan, P., & Bouglé, D. (1997). Digestive

absorption of iron bound to the 1-25 caseinophosphopeptide of beta-casein. *Le Lait*, 77(4),
433-440. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-75571f27-7e98-36ad-b389-6439f842e6a3>

Pérès, J., Bouhallab, S., Bureau, F., Maubois, J., Arhan, P., & Bouglé, D. (1999). Reduction of

iron/zinc interactions using metal bound to the caseinophosphopeptide 1–25 of β -casein.
Nutrition Research, 19(11), 1655–1663. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01568138/document>

Pes, D. (2022). Críptidos: péptidos biológicamente activos derivados de proteínas alimentarias de

interés para la salud [Trabajo de investigación para optar el Master universitario en
Nutrición y Salud, Universitat Oberta de Catalunya]. Archivo digital.
<http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/handle/10609/139528>

Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: A concise review. *Songklanakarin Journal of*

Science and Technology, 27(1), 201-212.
<https://www.researchgate.net/publication/26473403>

- Pinzón, A. (2019). *Pseudomonas*. Acta Medica Colombiana, 44 (1).
<http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v44n1/0120-2448-amc-44-01-52.pdf>
- PNIPA (2021). *Cadena de valor del langostino*. <https://pnipa.gob.pe/wp-content/uploads/2021/04/cadena-de-valor-del-langostino-PNIPA-2021.pdf>
- Podile, A. R. & Prakash, A. P. (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. Canadian journal of microbiology, 42(6), 533-538
- Prateep, A., Sumkhemthong, S., Suksomtip, M., Chanvorachote, P., & Chaotham, C. (2017). Peptides extracted from edible mushroom: *Lentinus squarrosulus* induces apoptosis in human lung cancer cells. Pharmaceutical Biology, 55(1), 1792–1799.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1325913>
- Primo, E. (2007). Proteínas IV: Enzimas. En Primo, E. (Eds.), *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Tomo II* (pp. 1016). Editorial Reverté.
- Pucci, G.; Acuña, A.; Llanes, M., Tiedemann, M. y Pucci, O. (2009). Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 44(1), 49-58.
https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-19572009000100005&script=sci_arttext
- Quirasco, M. y López-Munguía, A. (2006). Enzimas. En S. Badui. (Ed.), *Química de los alimentos* (pp. 301-362). Pearson Educación.
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes.

Molecules(Basel, Switzerland), 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>

Ramírez-Guerra, HE, Ramírez-Suarez, JC y Mazorra-Manzano, MA (2013). Propiedades biológicas de péptidos derivados del colágeno de organismos marinos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15 (3), 34-45. doi: <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.156>

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.

Rembado, F. y Sceni, P. (2009) *La química en los alimentos*. Instituto Nacional de Educación Tecnológica.

Revah- Moiseev, S. & Carroad, P. A. (1981). Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 1067-1078.

Rey, M. (2009). *Hidrolizados caseínicos totales y fraccionados. Evaluación de su acción promotora del crecimiento y estimulante de propiedades tecnológicas de las bacterias ácido lácticas*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional del Litoral]. Archivo digital. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/626>

Richard, K. R., Shelburne, J. S., & Kirk, J. K. (2011). Tolerability of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a review. *Clinical therapeutics*, 33(11), 1609–1629. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2011.09.028>

Rizzello, C., Tagliazucchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D. & Gianotti, A.

- (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549–569.
- Rocha, G, Kise, F., Rosso, A. y Parisi, M. (2013). Péptidos con actividad antimicrobiana obtenidos de proteínas lácteas con extractos de *Salpichroa origanifolia*. *Scielo*, 24 (2), 23-30. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000200004>
- Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus sp.* aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 107-113. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77612900011.pdf>
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147–154.
- Rovati, L. (2022, 15 de julio). 48 alimentos ricos en hierro y 48 recetas fáciles para ayudar a combatir la anemia. *Bebés y más*. <https://www.bebesymas.com/nutricion-embarazo/48-alimentos-ricos-hierro-48-recetas-faciles-no-cueste-mejorar-dieta>
- Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur, D., y Chel, L. (2013). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. En M. Segura-Campos, L. Chel y D. Betancur (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 11-27). OmniaScience. doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.34>
- Ruiz-García, C.; Bejar, V.; Martínez-Checa, F.; Llamas, I.; Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* Sp. Nov., a Surfactant-Producing Bacterium Isolated from the River Velez in

- Malaga, Southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55, 191–195.
- Sabbione, A. C., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2014, del 20 al 23 de octubre). Actividad antitrombótica de proteínas de amaranto sometidas a digestión gastrointestinal simulada. *III International Conference on Food Innovation (FoodInnova)*, Concordia, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/117314>
- Sánchez, T., León, J., Woolcott, J., & Arauco, K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Revista Peruana de Biología*, 11(2), 179-186. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332004000200010&lng=es&tlng=es.
- Saracho, V. (2011). Evaluación de la capacidad antioxidante asociada a péptidos bioactivos derivados de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diferentes ecosistemas [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.]. CIAD. <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/175>
- Saticioglu, I. B., Isbilir, F., Yavas, O., Avci, Z., Ozdemir, B., Suzer, B., Altun, S., & Duman, M. (2021). Description of lens atrophy caused by *Shewanella* sp. strain S-1, a putative novel species isolated from cultured rainbow trout. *Aquaculture*, 541, 736779. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736779>
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16 (2), 14-46.
- Selva, L. y Ochoa, A. (2011). Acciones para la prevención y control de la anemia por deficiencia de hierro en niños hasta cinco años. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37(3), 200-206.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662011000300003&lng=es&tlng=pt.

Sharma, S., Singh, R. y Rana, S. (2011). Bioactive Peptides: A Review. *Int. J. Bioautomation*, 15(4), 223-250. http://www.clbme.bas.bg/bioautomation/2011/vol_15.4/files/15.4_02.pdf

Sharma, V., & Kundu, P. P. (2010). Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(5), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.001>

Shimizu, M. & Son, D. O. (2007). Food-derived peptides and intestinal functions. *Current pharmaceutical design*, 13(9), 885–895. <https://doi.org/10.2174/138161207780414287>

Sigma Aldrich (s.f.). *Análisis de la Actividad Enzimática*. <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/applications/protein-biology/enzyme-activity-assays>

Silver, R. S., Brown, P. H., Boyd, M., & Woolfschoon-Pombo, A. F. (2007). Producto fuertemente aromatizado para el uso en la fabricación de queso y procedimiento para producirlo. 2276508.

Sirvas, S., Buleje, V., Salvatierra, L., y Jaramillo, M. (2021). Aislamiento e identificación de bacterias proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas y quitinolíticas de residuos de langostinos. *Revista Peruana De Biología*, 28(1), e18353. <https://doi.org/10.15381/rpb.v28i1.18353>

Solano, E. (2017). Modelo de digestión gastrointestinal In vitro para la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y quelantes de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Archivo digital. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/8225>

Staley, J. T., & Stanley, P. M. (1986). Potential commercial applications in aquatic microbiology.

- Microbial Ecology, 12(1), 79–100. <https://doi.org/10.1007/BF02153224>
- Stenström, I. M., & Molin, G. (1990). Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. *The Journal of applied bacteriology*, 68(6), 601–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb05226.x>
- Stulc, T., & Sedo, A. (2010). Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: is there a risk of oncological and immunological adverse effects?. *Diabetes research and clinical practice*, 88(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.02.017>
- Swaisgood, H.E. (2003). Protein composition of milk: identification, structure and chemical composition. En P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.). *Advanced dairy chemistry: proteins part A*. (pp. 140-225). Springer Science.
- Takano, T. (1998). Milk Derived Peptides and Hypertension Reduction. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 375–381. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00060-0)
- Takahashi, Y., Kamata, A. & Konishi, T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from salmon milt and their effects on postprandial blood glucose level. *Fish Sci* 87, 619–626 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01530-9>
- Tamara, A. y Mercado, A. (2021). Caracterización de bacterias adaptadas al frío lipolíticas, proteolíticas, celulolíticas y amilolíticas de la Isla Livingston, Antártida. [Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Bolívar]. Archivo digital. https://utb.alma.exlibrisgroup.com/view/delivery/57UTB_INST/1224956980005731
- Teschemacher, H. (2003). Opioid Receptor Ligands Derived from Food Proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1331-1344. <https://doi.org/10.2174/1381612033454856>

- Torres, V. (2020). Capacidad antioxidante de fracciones moleculares de extractos de queso añejo de zacazonapan, México durante su maduración. En V. Torres. (Ed.). *Determinación de bioactividades en queso de Zacazonapan durante maduración y sus atributos tangibles e intangibles* (pp. 159-189). Universidad Autónoma Chapingo
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134(3), 1585–1588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.112>
- Toyes, E. (2016). Aprovechamiento de subproductos marinos para la alimentación de camarón decultivo y gallinas ponedoras. [Tesis doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. Archivo digital. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/215/1/toyes_e.pdf
- Udenigwe, Ch.; & Aluko, R. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits, 71(1), R11-R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- Ueki, N., Someya, K., Matsuo, Y., Wakamatsu, K., & Mukai, H. (2007). Cryptides: Functional cryptic peptides hidden in protein structures. *Biopolymers*, 88(2), 190–198. <https://doi.org/10.1002/bip.20687>
- Umbreit, J. (2005). Iron deficiency: A concise review. *American Journal of Hematology*, 78(3), 225-231. <https://doi.org/10.1002/ajh.20249>
- Undurraga, D., Markovits, A. & Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry*, 36(10), 933-939.

- Urango, L., Montoya, G., Cuadros, M., Henao, D., Zapata, P., López, L., Castaño, E., Serna, A., Vanegas, Cl., Loaiza, M. y Davahiva, B. (2009). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1), 27-38. <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v11n1/v11n1a3.pdf>
- Vargas, J. (2018). *Evaluación de la capacidad antioxidante y quelante de hidrolizados proteicos de pasta residual de Jatropha Curcas L. obtenida de almendra y semilla completa* [Tesis de pregrado, Instituto Politécnico Nacional, México]. Archivo digital. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/26770>
- 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. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- Vilcacundo, R. (2017). Liberación de péptidos multifuncionales durante la digestión gastrointestinal simuladas de proteínas de quinua y amaranto. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. CSIC-UAM. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/683691/vilcacundo_chamorro_ruben_dario.pdf?sequence=1
- Vioque, J. y Millán, F. (2006). Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación*, 26, 96-102. <http://hdl.handle.net/10261/5750>
- Vizcardo, D. y Zavala, J. (2016). Péptidos bioactivos: pequeños gigantes en salud. *Sociedad Peruana Medica Interna*, 29(4), 150-155.

<http://revistamedicinainterna.net/index.php/spmi/article/view/88/87>

- Walker, G.; Cai, F.; Shen, P.; Reynolds, C.; Ward, B.; Fone, Ch.; Honda, S.; Koganei, M.; Oda, M.; & Reynolds, E. (2006). Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 74- 78. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001482>
- Walters, M., Esfandi, R. & Tsopmo, A. (2018). Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods*, 7(10), 172. <https://doi.org/10.3390/foods7100172>
- 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. *LWT*, 75,93–99.
- Whitehurst, R. & Law, B. (2002). *Enzymes in food technology*. Sheffield Academic Press. <https://toaz.info/doc-view>
- Wiseman, A. (1991). *Manual de Biotecnología de las Enzimas*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Wong, M. H., Tang, L. Y., & Kwok, F. S. (1996). The use of enzyme-digested soy bean residue for feeding common carp. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 9(4), 418-423.
- Wu, W.; Li, B.; Hou, H.; Zhang, H.; Zhao, X. (2017). Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *Journal of Functional Foods*, 35(), 418–427.
- Xie, M., Liu, D., & Yang, Y. (2020). Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action,

- reconstruction and modification. *Open Biology*, 10(7), 200004.
<https://doi.org/10.1098/rsob.200004>
- Yaba Adje, E.; Balti, R.; Kouach, M.; Dhulster, P.; Guillochon, D.; Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. , 49(2), 0–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.004>
- Yamamoto, Naoyuki; Akino, Atsuko; Takano, Toshiaki (1994). Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77(4), 917–922.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77026-0)
- Yang, F., Chen, X., Huang, M., Yang, Q., Cai, X., Chen, X., Du, M., Huang, J. & Wang, S. (2021). Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313–2332.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63463-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63463-3)
- Yañez, A y Ayerbe, K. (2021). Alimentación complementaria y anemia ferropénica en niños de 6 a 12 meses, C.S. Maritza Campos Díaz, Arequipa 2021. [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Ica]. Archivo digital.
<http://repositorio.autonomadeica.edu.pe/handle/autonomadeica/1558>
- Yousfi, K., Bekal, S., Usongo, V., & Touati, A. (2017). Current trends of human infections and antibiotic resistance of the genus *Shewanella*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(8), 1353–1362. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2962-3>
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Setner, B., Dąbrowska, A., Szołtysik, M., Babij, K., Szewczuk, Z.,

- Trziszka, T., Lubec, G., & Chrzanowska, J. (2014). Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino Acids*, 47(2), 369- 380. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1869-x>
- Zhang, Y., Chen, R., Ma, H., & Chen, S. (2015). Isolation and Identification of Dipeptidyl Peptidase IV-Inhibitory Peptides from Trypsin/Chymotrypsin-Treated Goat Milk Casein Hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8819– 8828. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03062>
- Zheng, L., Xiaotian, H., Chen, HM & Lin, W. (2005). Marine bacteria associated with marine macroorganism: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*, 55 (2), 119-124.
- Zhong, Q., Li, X., Hu, W., Zeng, B., Liang, R., Liu, H., Li, Z. & Zhang, Z. (2016). Phosvitin phosphopeptide preparation using immobilised trypsin and enhancing calcium absorption in growing rats. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(4), 325-331. <https://doi.org/10.17221/425/2015-CJFS>
- Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J., & Rosselló-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 1, 179–186. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-179>

IX. ANEXOS

9.1. %GH

Anexo 1: Resumen del ANOVA-una vía

 Ordinary one-way ANOVA ANOVA results						
1	Table Analyzed	Data 1				
2	Data sets analyzed	A-E				
3						
4	ANOVA summary					
5	F	117.5				
6	P value	<0.0001				
7	P value summary	****				
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
9	R square	0.9891				
10						
11	Brown-Forsythe test					
12	F (DFn, DFd)	33.47 (4, 15)				
13	P value	<0.0001				
14	P value summary	****				
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
16						
17	Bartlett's test					
18	Bartlett's statistic (corrected)	19.00				
19	P value	0.0008				
20	P value summary	***				
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
22						
23	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
24	Treatment (between columns)	64.64	4	16.16	F (4, 15) = 117.5	P<0.0001
25	Residual (within columns)	2.063	15	0.1375		
26	Total	66.70	19			
27						

Anexo 2: Detalle del ANOVA-una vía

Number of families 1

Number of comparisons per family 10

Alpha 0.05

Tukey's multiple

comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
RL-15 (08) vs. BK	1.763	0.9528 to 2.572	Yes	****	<0.0001	B-A
RL-15 (19) vs. BK	3.103	2.293 to 3.912	Yes	****	<0.0001	C-A
RL-15 (41) vs. BK	3.563	2.753 to 4.372	Yes	****	<0.0001	D-A
RL-15 (42) vs. BK	5.365	4.555 to 6.175	Yes	****	<0.0001	E-A
RL-15 (19) vs. RL-15 (08)	1.340	0.5303 to 2.150	Yes	**	0.0010	C-B
RL-15 (41) vs. RL-15 (08)	1.800	0.9903 to 2.610	Yes	****	<0.0001	D-B
RL-15 (42) vs. RL-15 (08)	3.603	2.793 to 4.412	Yes	****	<0.0001	E-B
RL-15 (41) vs. RL-15 (19)	0.4600	-0.3497 to 1.270	No	ns	0.4331	D-C
RL-15 (42) vs. RL-15 (19)	2.263	1.453 to 3.072	Yes	****	<0.0001	E-C
RL-15 (42) vs. RL-15 (41)	1.803	0.9928 to 2.612	Yes	****	<0.0001	E-D

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	Q	DF
RL-15 (08) vs. BK	16.42	14.66	1.763	0.2622	4	4	9.506	15
RL-15 (19) vs. BK	17.76	14.66	3.103	0.2622	4	4	16.73	15
RL-15 (41) vs. BK	18.22	14.66	3.563	0.2622	4	4	19.21	15
RL-15 (42) vs. BK	20.03	14.66	5.365	0.2622	4	4	28.94	15
RL-15 (19) vs. RL-15 (08)	17.76	16.42	1.340	0.2622	4	4	7.227	15
RL-15 (41) vs. RL-15 (08)	18.22	16.42	1.800	0.2622	4	4	9.708	15
RL-15 (42) vs. RL-15 (08)	20.03	16.42	3.603	0.2622	4	4	19.43	15
RL-15 (41) vs. RL-15 (19)	18.22	17.76	0.4600	0.2622	4	4	2.481	15
RL-15 (42) vs. RL-15 (19)	20.03	17.76	2.263	0.2622	4	4	12.20	15
RL-15 (42) vs. RL-15 (41)	20.03	18.22	1.803	0.2622	4	4	9.721	15

9.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Anexo 3: Resumen del ANOVA-dos vías

Table Analyzed	Data 5				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Tiempo de fermentacion	5.729	0.0842	ns	No	
Codigo de cepa	74.12	0.0004	***	Yes	
Interaction: Tiempo de fermentacion x Codigo de cepa	18.79	0.0008	***	Yes	
Interaction: Tiempo de fermentacion x Subject	0.1014				
Interaction: Codigo de cepa x Subject	0.8383				
Subject	0.1014				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo de fermentacion	0.002714	1	0.002714	F (1, 1) = 56.49	P=0.0842
Codigo de cepa	0.03512	4	0.008779	F (4, 4) = 88.41	P=0.0004
Interaction: Tiempo de fermentacion x Codigo de cepa	0.008902	4	0.002225	F (4, 4) = 58.49	P=0.0008
Interaction: Tiempo de fermentacion x Subject	4.805e-005	1	4.805e-005		
Interaction: Codigo de cepa x Subject	0.0003972	4	9.930e-005		
Subject	4.805e-005	1	4.805e-005		
Residual	0.0001522	4	3.805e-005		

Anexo 4: Detalle de las ANOVA-dos vías

Compare cell means regardless
of rows and columns

Number of families 1
Number of comparisons per
family 45
Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A (24 h):BK vs. A (48 h):BK	0.000	-0.03414 to 0.03414	No	ns	>0.9999
A (24 h):8 vs. A (24 h):41	0.006500	-0.02764 to 0.04064	No	ns	0.9672
A (24 h):8 vs. A (24 h):42	-0.1250	-0.1591 to -0.09086	Yes	***	0.0003
A (24 h):8 vs. A (48 h):8	-0.007500	-0.04164 to 0.02664	No	ns	0.9339
A (24 h):19 vs. A (48 h):19	2.082e-017	-0.03414 to 0.03414	No	ns	>0.9999
A (24 h):41 vs. A (24 h):42	-0.1315	-0.1656 to -0.09736	Yes	***	0.0003
A (24 h):41 vs. A (48 h):41	0.01800	-0.01614 to 0.05214	No	ns	0.3212
A (24 h):42 vs. A (48 h):42	0.1060	0.07186 to 0.1401	Yes	***	0.0007
A (48 h):8 vs. A (48 h):41	0.03200	-0.002137 to 0.06614	No	ns	0.0621
A (48 h):8 vs. A (48 h):42	-0.01150	-0.04564 to 0.02264	No	ns	0.6947
A (48 h):41 vs. A (48 h):42	-0.04350	-0.07764 to -0.009363	Yes	*	0.0214

Anexo 5: Resumen del ANOVA-dos vías

Table Analyzed	Data 3				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Codigo de cepa	38.85	0.0180	*	Yes	0.2500
Tipo de fraccion	7.338	0.1027	ns	No	0.2000
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	52.76	0.0786	ns	No	0.05000
Interaction: Codigo de cepa x Azoc hidrol	0.03109				
Interaction: Tipo de fraccion x Azoc hidrol	0.1943				
Azoc hidrol	0.008720				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Codigo de cepa	0.03929	4	0.009822	F (1.000, 1.000) = 1250	P=0.0180
Tipo de fraccion	0.007419	5	0.001484	F (1.000, 1.000) = 37.76	P=0.1027
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	0.05335	20	0.002668	F (1.000, 1.000) = 65.00	P=0.0786
Interaction: Codigo de cepa x Azoc hidrol	3.143e-005	4	7.858e-006		
Interaction: Tipo de fraccion x Azoc hidrol	0.0001965	5	3.930e-005		
Azoc hidrol	8.817e-006	1	8.817e-006		
Residual	0.0008208	20	4.104e-005		

Anexo 6: Detalle de las ANOVA-dos vías

Compare cell means regardless
of rows and columns

Number of families 1
Number of comparisons per
Family 344
Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean			Significant?	Summary	Adjusted P Value
	Diff.	95.00% CI of diff.				
BK:A (24h) vs. 8:A (48h)	-0.04900	-0.07441 to -0.02359		Yes		
BK:A (24h) vs. 41:A (48h)	-0.01700	-0.05512 to 0.02112		No		
BK:A (24h) vs. 42:A (48h)	-0.06050	-0.1939 to 0.07292		No		
BK:S (24h) vs. 19:S (48h)	-0.04050	-0.05956 to -0.02144		Yes		
BK:S (24h) vs. 41:S (48h)	-0.04600	-0.1476 to 0.05565		No		
BK:P (24h) vs. 8:P (48h)	-0.04650	-0.09097 to -0.002028		Yes		
BK:P (24h) vs. 41:P (48h)	-0.04300	-0.05571 to -0.03029		Yes		
BK:P (24h) vs. 42:P (48h)	-0.06600	-0.1549 to 0.02294		No		
8:A (24h) vs. 8:S (24h)	0.04150	0.009734 to 0.07327		Yes		
8:A (24h) vs. 8:P (24h)	0.01550	-0.05438 to 0.08538		No		
8:A (24h) vs. 8:A (48h)	-0.007500	-0.01385 to -0.001147		Yes		
8:A (24h) vs. 19:A (48h)	0.04150	0.009734 to 0.07327		Yes		
8:S (24h) vs. 8:P (24h)	-0.02600	-0.06412 to 0.01212		No		

8:P (24h) vs. 8:P (48h)	-0.02050	-0.02685 to -0.01415	Yes
8:A (48h) vs. 8:S (48h)	0.04900	0.02359 to 0.07441	Yes
8:A (48h) vs. 8:P (48h)	0.002500	-0.06738 to 0.07238	No
8:S (48h) vs. 8:P (48h)	-0.04650	-0.09097 to -0.002028	Yes
19:A (24h) vs. 19:S (24h)	-0.02100		Yes
19:S (24h) vs. 19:P (24h)	0.02100		Yes
19:S (24h) vs. 19:S (48h)	-0.01950	-0.03856 to -0.0004407	Yes
19:A (48h) vs. 19:S (48h)	-0.04050	-0.05956 to -0.02144	Yes
19:S (48h) vs. 19:P (48h)	0.04050	0.02144 to 0.05956	Yes
41:A (24h) vs. 41:S (24h)	-0.04850	-0.2836 to 0.1866	No
41:A (24h) vs. 41:P (24h)	-0.007000	-0.1468 to 0.1328	No
41:A (24h) vs. 41:A (48h)	0.01800	-0.1599 to 0.1959	No
41:S (24h) vs. 41:P (24h)	0.04150	-0.05380 to 0.1368	No
41:S (24h) vs. 41:S (48h)	0.03750	0.03115 to 0.04385	Yes
41:P (24h) vs. 41:P (48h)	-0.001000	-0.01371 to 0.01171	No
41:A (48h) vs. 41:S (48h)	-0.02900	-0.09253 to 0.03453	No
41:A (48h) vs. 41:P (48h)	-0.02600	-0.07682 to 0.02482	No
41:S (48h) vs. 41:P (48h)	0.003000	-0.1114 to 0.1174	No
42:A (24h) vs. 42:S (24h)	0.1665	0.05850 to 0.2745	Yes
42:A (24h) vs. 42:P (24h)	0.02700	-0.1255 to 0.1795	No
42:A (24h) vs. 42:A (48h)	0.1060	0.08059 to 0.1314	Yes
42:S (24h) vs. 42:P (24h)	-0.1395	-0.1840 to -0.09503	Yes
42:P (24h) vs. 42:P (48h)	0.07350	0.02903 to 0.1180	Yes
42:A (48h) vs. 42:S (48h)	0.06050	-0.07292 to 0.1939	No
42:A (48h) vs. 42:P (48h)	-0.005500	-0.2279 to 0.2169	No
42:S (48h) vs. 42:P (48h)	-0.06600	-0.1549 to 0.02294	No

9.3. PROTEÍNA SOLUBLE

Anexo 07: Resumen del ANOVA-dos vías

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	data 2				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Tiempo de fermentación	0.7294	0.5704	ns	No	1.000
Código de cepa	78.26	0.1048	ns	No	0.2500
Interaction: Tiempo de fermentación x Código de cepa	6.768	0.5612	ns	No	0.2500
Interaction: Tiempo de fermentación x Subject	1.139				
Interaction: Código de cepa x Subject	2.158				
Subject	0.9823				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo de fermentación	0.7613	1	0.7613	F (1, 1) = 0.6404	P=0.5704
Código de cepa	81.67	4	20.42	F (1.000, 1.000) = 36.26	P=0.1048
Interaction: Tiempo de fermentación x Código de cepa	7.063	4	1.766	F (1.000, 1.000) = 0.6789	P=0.5612
Interaction: Tiempo de fermentación x Subject	1.189	1	1.189		
Interaction: Código de cepa x Subject	2.252	4	0.5631		
Subject	1.025	1	1.025		
Residual	10.40	4	2.601		

Anexo 08: Detalle de las ANOVA-dos vías

Number of families	1				
Number of comparisons per family	45				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A(24h):BK vs. A(48h):BK	-0.03450	-14.32 to 14.25	No	ns	>0.9999
A(24h):8 vs. A(48h):8	1.829	-64.69 to 68.34	No	ns	0.9676
A(24h):19 vs. A(48h):19	-1.306	-7.367 to 4.755	No	ns	0.2501
A(24h):41 vs. A(48h):41	1.654	-39.57 to 42.88	No	ns	0.8851
A(24h):42 vs. A(48h):42	-0.1915	-72.22 to 71.83	No	ns	>0.9999

Anexo 09: Resumen del ANOVA-dos vías

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	24h				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Codigo de cepa	22.96	0.0673	ns	No	0.2500
Tipo de fraccion	16.18	0.0803	ns	No	0.5000
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	59.85	0.0435	*	Yes	0.1250
Interaction: Codigo de cepa x Subject	0.2587				
Interaction: Tipo de fraccion x Subject	0.2604				
Subject	0.2098				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Codigo de cepa	3839	4	959.8	F (1.000, 1.000) = 88.74	P=0.0673
Tipo de fraccion	2706	2	1353	F (1.000, 1.000) = 62.14	P=0.0803
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	10009	8	1251	F (1.000, 1.000) = 213.4	P=0.0435
Interaction: Codigo de cepa x Subject	43.26	4	10.81		
Interaction: Tipo de fraccion x Subject	43.54	2	21.77		
Subject	35.08	1	35.08		
Residual	46.90	8	5.862		

Anexo 10: Detalle de las ANOVA-dos vías

Compare cell means regardless of rows
and columns

Number of families	1
Number of comparisons per family	104
Alpha	0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
BK:A vs. BK:S	17.91	13.26 to 22.56	Yes		
BK:A vs. BK:P	3.344	-1.961 to 8.648	No		
BK:S vs. BK:P	-14.56	-24.52 to -4.607	Yes		
8:A vs. 8:S	-38.97	-88.32 to 10.37	No		
8:A vs. 8:P	-5.015	-8.115 to -1.915	Yes		
8:S vs. 8:P	33.96	-18.49 to 86.40	No		
19:A vs. 19:S	16.27	14.05 to 18.48	Yes		
19:A vs. 19:P	-12.94	-19.36 to -6.517	Yes		
19:S vs. 19:P	-29.21	-33.41 to -25.00	Yes		
41:A vs. 41:S	-36.41	-71.82 to -1.007	Yes		
41:A vs. 41:P	-36.41	-71.82 to -1.007	Yes		
42:A vs. 42:S	-74.26	-163.4 to 14.92	No		
42:A vs. 42:P	5.443	-7.054 to 17.94	No		
42:S vs. 42:P	79.70	3.022 to 156.4	Yes		

Anexo 11: Resumen del ANOVA-dos vías

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	48h				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Codigo de cepa	14.43	0.0725	ns	No	0.2500
Tipo de fraccion	28.50	0.0434	*	Yes	0.5000
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	56.60	0.0258	*	Yes	0.1250
Interaction: Codigo de cepa x Subject	0.1889				
Interaction: Tipo de fraccion x Subject	0.1329				
Subject	0.05921				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Codigo de cepa	3081	4	770.3	F (1.000, 1.000) = 76.40	P=0.0725
Tipo de fraccion	6083	2	3042	F (1.000, 1.000) = 214.5	P=0.0434
Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	12082	8	1510	F (1.000, 1.000) = 609.9	P=0.0258
Interaction: Codigo de cepa x Subject	40.33	4	10.08		
Interaction: Tipo de fraccion x Subject	28.36	2	14.18		
Subject	12.64	1	12.64		
Residual	19.81	8	2.476		

Anexo 12: Detalle de las ANOVA-dos vías

-Compare cell means regardless of rows and columns						
-Number of families	1					
-Number of comparisons per family	105					
-Alpha	0.05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
BK:A vs. BK:S	18.20	16.97 to 19.44	Yes	*	0.0211	
BK:A vs. BK:P	-0.4360	-25.65 to 24.77	No	ns	0.9985	
BK:S vs. BK:P	-18.64	-45.08 to 7.807	No	ns	0.0876	
8:A vs. 8:S	-56.39	-177.5 to 64.75	No	ns	0.1160	
8:A vs. 8:P	-0.8185	-83.81 to 82.17	No	ns	>0.9999	
8:S vs. 8:P	55.57	-148.6 to 259.7	No	ns	0.2013	
19:A vs. 19:S	10.22	0.9896 to 19.46	Yes	*	0.0376	
19:A vs. 19:P	-15.71	-59.98 to 28.57	No	ns	0.1556	
19:S vs. 19:P	-25.93	-79.44 to 27.58	No	ns	0.1113	
41:A vs. 41:S	-42.51	-79.40 to -5.611	Yes	*	0.0336	
41:A vs. 41:P	2.787	-3.375 to 8.948	No	ns	0.1197	
41:S vs. 41:P	45.29	14.56 to 76.03	Yes	*	0.0220	
42:A vs. 42:S	-83.82	-171.1 to 3.499	No	ns	0.0555	
42:A vs. 42:P	7.454	-7.304 to 22.21	No	ns	0.1070	
42:S vs. 42:P	91.27	-10.80 to 193.3	No	ns	0.0650	

9.4. ACTIVIDAD QUELANTE

Anexo 13: Resumen del ANOVA-dos vías

2way ANOVA ANOVA results						
1	Table Analyzed	%Fe quelado				
2						
3	Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
4	Assume sphericity?	No				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
8	Codigo de cepa	26.48	0.0663	ns	No	0.2000
9	Tipo de fraccion	16.28	0.0295	*	Yes	0.2000
10	Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	55.73			No	
11	Interaction: Codigo de cepa x %Fe quelado	0.2889				
12	Interaction: Tipo de fraccion x %Fe quelado	0.03504				
13	%Fe quelado	0.004624				
14						
15	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
16	Codigo de cepa	10888	5	2177	F (1.000, 1.000) = 91.66	P=0.0663
17	Tipo de fraccion	6694	5	1339	F (1.000, 1.000) = 464.7	P=0.0295
18	Interaction: Codigo de cepa x Tipo de fraccion	22913	25	916.5	F (25, 25) = 47.18	
19	Interaction: Codigo de cepa x %Fe quelado	118.8	5	23.75		
20	Interaction: Tipo de fraccion x %Fe quelado	14.41	5	2.881		
21	%Fe quelado	1.901	1	1.901		
22	Residual	485.6	25	19.43		
23						
24	Data summary					
25	Number of columns (Tipo de fraccion)	6				
26	Number of rows (Codigo de cepa)	6				
27	Number of subjects (#%Fe quelado)	6				

Anexo 14: Detalle de las ANOVA-dos vías

-Compare cell means
regardless of rows and
columns

-Number of families 1
-Number of comparisons per
family 627
-Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
EDTA:A(24h) vs. BK:A(24h)	-7.685	-31.51 to 16.14	No		
EDTA:A(24h) vs. 8:A(24h)	-36.42	-46.84 to -26.00	Yes		
EDTA:A(24h) vs. 19:A(24h)	-21.84	-135.7 to 92.08	No		
EDTA:A(24h) vs. 41:A(24h)	-26.55	-167.5 to 114.4	No		
EDTA:A(24h) vs. 42:A(24h)	-13.11	-48.36 to 22.15	No		
EDTA:S(24h) vs. BK:S(24h)	-46.04	-83.71 to -8.361	Yes		
EDTA:S(24h) vs. 8:S(24h)	18.23	-32.03 to 68.48	No		
EDTA:S(24h) vs. 19:S(24h)	-45.84	-86.05 to -5.620	Yes		
EDTA:S(24h) vs. 41:S(24h)	30.21	0.02776 to 60.38	Yes		
EDTA:S(24h) vs. 42:S(24h)	28.63	-17.62 to 74.88	No		
EDTA:P(24h) vs. BK:P(24h)	-35.14	-37.05 to -33.23	Yes		
EDTA:P(24h) vs. 8:P(24h)	-8.130	-11.94 to -4.318	Yes		
EDTA:P(24h) vs. 19:P(24h)	-41.77	-82.11 to -1.423	Yes		
EDTA:P(24h) vs. 41:P(24h)	-40.54	-71.67 to -9.410	Yes		
EDTA:P(24h) vs. 42:P(24h)	-44.17	-45.12 to -43.21	Yes		
EDTA:A(48h) vs. BK:A(48h)	-9.045	-11.78 to -6.313	Yes		
EDTA:A(48h) vs. 8:A(48h)	-35.22	-76.13 to 5.694	No		
EDTA:A(48h) vs. 19:A(48h)	-33.42	-41.30 to -25.54	Yes		
EDTA:A(48h) vs. 41:A(48h)	-35.22	-71.05 to 0.6115	No		
EDTA:A(48h) vs. 42:A(48h)	-13.41	-29.55 to 2.727	No		
EDTA:S(48h) vs. BK:S(48h)	-36.44	-54.92 to -17.95	Yes		
EDTA:S(48h) vs. 8:S(48h)	13.03	-27.19 to 53.24	No		
EDTA:S(48h) vs. 19:S(48h)	-48.81	-86.80 to -10.82	Yes		
EDTA:S(48h) vs. 41:S(48h)	23.90	-46.37 to 94.17	No		
EDTA:S(48h) vs. 42:S(48h)	25.95	-18.27 to 70.17	No		
EDTA:P(48h) vs. BK:P(48h)	-37.14	-39.05 to -35.23	Yes		
EDTA:P(48h) vs. 8:P(48h)	-30.54	-50.23 to -10.85	Yes		
EDTA:P(48h) vs. 19:P(48h)	-33.94	-61.26 to -6.622	Yes		
EDTA:P(48h) vs. 41:P(48h)	-54.36	-101.8 to -6.897	Yes		
EDTA:P(48h) vs. 42:P(48h)	-44.16	-85.71 to -2.611	Yes		
BK:A(24h) vs. BK:S(24h)	-49.96	-58.28 to -41.63	Yes		
BK:A(24h) vs. BK:P(24h)	-33.34	-39.12 to -27.55	Yes		
BK:S(24h) vs. BK:P(24h)	16.62	14.08 to 19.16	Yes		
BK:A(48h) vs. BK:S(48h)	-39.00	-82.39 to 4.397	No		
BK:A(48h) vs. BK:P(48h)	-33.98	-49.29 to -18.66	Yes		
BK:S(48h) vs. BK:P(48h)	5.020	-53.68 to 63.72	No		
8:A(24h) vs. 8:S(24h)	43.04	25.38 to 60.70	Yes		

8:A(24h) vs. 8:P(24h)	22.41	12.88 to 31.94	Yes
8:S(24h) vs. 8:P(24h)	-20.63	-28.76 to -12.50	Yes
8:A(48h) vs. 8:S(48h)	36.64	13.77 to 59.51	Yes
8:A(48h) vs. 8:P(48h)	-1.200	-6.282 to 3.882	No
8:S(48h) vs. 8:P(48h)	-37.84	-55.63 to -20.05	Yes
19:A(24h) vs. 19:S(24h)	-35.61	-167.6 to 96.35	No
19:A(24h) vs. 19:P(24h)	-25.81	-196.2 to 144.6	No
19:S(24h) vs. 19:P(24h)	9.795	-28.64 to 48.23	No
19:A(48h) vs. 19:S(48h)	-27.00	-34.94 to -19.05	Yes
19:A(48h) vs. 19:P(48h)	-6.400	-41.98 to 29.18	No
19:S(48h) vs. 19:P(48h)	20.60	-7.041 to 48.23	No
41:A(24h) vs. 41:S(24h)	45.15	-87.83 to 178.1	No
41:A(24h) vs. 41:P(24h)	-19.88	-175.8 to 136.1	No
41:S(24h) vs. 41:P(24h)	-65.02	-88.02 to -42.02	Yes
41:A(48h) vs. 41:S(48h)	47.52	35.25 to 59.78	Yes
41:A(48h) vs. 41:P(48h)	-25.02	-52.78 to 2.748	No
41:S(48h) vs. 41:P(48h)	-72.53	-88.03 to -57.03	Yes
42:A(24h) vs. 42:S(24h)	30.13	18.95 to 41.31	Yes
42:A(24h) vs. 42:P(24h)	-36.94	-57.02 to -16.86	Yes
42:S(24h) vs. 42:P(24h)	-67.07	-75.96 to -58.18	Yes
42:A(48h) vs. 42:S(48h)	27.76	21.85 to 33.66	Yes
42:A(48h) vs. 42:P(48h)	-36.63	-78.18 to 4.919	No
42:S(48h) vs. 42:P(48h)	-64.39	-111.8 to -16.93	Yes

Anexo 15: Resumen del ANOVA-dos vías

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	data				
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Tiempo de fermentación	1.535	0.0167	*	Yes	1.000
Codigo de cepa	86.21	0.1583	ns	No	0.2000
Interaction: Tiempo de fermentación x Codigo de cepa	3.029	0.5304	ns	No	0.2000
Interaction: Tiempo de fermentación x Subject	0.001062				
Interaction: Codigo de cepa x Subject	5.554				
Subject	0.005994				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tiempo de fermentación	71.59	1	71.59	F (1, 1) = 1446	P=0.0167
Codigo de cepa	4020	5	804.0	F (1.000, 1.000) = 15.52	P=0.1583
Interaction: Tiempo de fermentación x Codigo de cepa	141.3	5	28.25	F (1.000, 1.000) = 0.8257	P=0.5304
Interaction: Tiempo de fermentación x Subject	0.04950	1	0.04950		
Interaction: Codigo de cepa x Subject	259.0	5	51.80		
Subject	0.2795	1	0.2795		
Residual	171.1	5	34.22		

Anexo 16: Detalle de las ANOVA-dos vías

-Compare cell means regardless of rows and columns

-Number of families 1

-Number of comparisons per family 65

-Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A(24h):BK vs. A(48h):BK	-1.360	-22.45 to 19.73	No		
A(24h):8 vs. A(48h):8	1.200	-29.29 to 31.69	No		
A(24h):19 vs. A(48h):19	-11.59	-133.4 to 110.2	No		
A(24h):41 vs. A(48h):41	-8.675	-113.8 to 96.47	No		
A(24h):42 vs. A(48h):42	-0.3050	-19.43 to 18.82	No		