

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN JUNIOR PIJ-16-12**

***"Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria"***

En la ciudad de Quito D.M., a los trece días del mes de abril del año dos mil veintitrés, comparecen a la celebración de la presente Acta de Finalización del Proyecto de Investigación Junior **PIJ-16-12 "Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria"**, por una parte, la **Dra. Alexandra Patricia Alvarado Cevallos** en calidad de **Vicerrectora de Investigación, Innovación y Vinculación** de la Escuela Politécnica Nacional, y por otra el **Dr. Mauricio Esteban Mosquera Jordán** en calidad de **Director del Proyecto de Investigación Junior PIJ-16-12**, al tenor de lo siguiente:

**1. ANTECEDENTES:**

- El 9 de mayo de 2016, el Consejo de Investigación y Proyección Social mediante Resolución 036/16, aprueba el Cronograma para el lanzamiento de la Convocatoria para la presentación de Proyectos de Investigación Internos, Semilla, Junior y Multi e Interdisciplinarios 2016.
- El 9 de febrero de 2017, al amparo de lo dispuesto por Consejo de Investigación y Proyección Social, mediante Resolución 012/17, se aprobaron los proyectos de investigación de la Convocatoria 2016, entre ellos el proyecto de investigación junior denominado *Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria*, presentado por el Dr. Mauricio Mosquera.
- Mediante Memorando EPN-VIPS-2017-0470-M del 6 de marzo de 2017, el Vicerrectorado de Investigación y Proyección Social notifica al Dr. Mauricio Mosquera que se ha aprobado el Proyecto de Investigación Junior PIJ-16-12 *"Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria"*.
- Mediante Memorando EPN-VIPS-2017-0747-M del 10 de abril de 2017, el Vicerrectorado de Investigación y Proyección Social notifica a los directores de los proyectos junior 2016 que el inicio de los proyectos es el 17 de abril de 2017.
- Mediante Resolución RCIPS-036-2019 del 19 de febrero de 2019, Consejo de Investigación y Proyección Social aprueba la prórroga ordinaria del Proyecto PIJ-16-12, por lo que su ejecución es hasta el 16 de octubre de 2019.

**2. DATOS GENERALES DEL PROYECTO:**

<b>Código del proyecto</b>	PIJ-16-12
<b>Título del proyecto</b>	Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria
<b>Director</b>	MAURICIO ESTEBAN MOSQUERA JORDAN
<b>Colaboradores</b>	JENNY MARCELA AVILA VELEZ MARCO VINICIO SINCHE SERRA
<b>Departamento</b>	Ciencia de los alimentos y biotecnología (DECAB)
<b>Líneas de investigación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis orgánica no convencional</li> <li>• Propiedades de los alimentos</li> </ul>
<b>Objetivo</b>	Analizar la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria



<b>Duración del proyecto</b>	-Fecha de Inicio: 17 de abril de 2017 -Fecha de Fin Planeada: 16 de abril de 2019 -Prórroga ordinaria: hasta el 16 de octubre de 2019 -Duración total: 30 meses
<b>Presupuesto aprobado</b>	\$ 89.556,32 USD
<b>Presupuesto ejecutado</b>	\$ 81.558,46 USD
<b>Fecha entrega informe final:</b>	26 de febrero de 2023

### 3. INFORME FINAL:

Mediante Memorando EPN-PIJ-16-12-2023-0002-M del 26 de febrero de 2023 y EPN-PIJ-16-12-2023-0003-M del 6 de abril de 2023, el Dr. Mauricio Mosquera, Director del Proyecto de Investigación Junior PIJ-16-12, presenta el Informe Final del proyecto que dirige, mismo que es revisado por la Dirección de Investigación, que se anexa y forma parte integrante de la presente Acta de Finalización, cuyas conclusiones y productos generados son:

#### CONCLUSIONES:

- La harina de cabezas y cuellos de pollo presenta una fuente concentrada de proteínas y aminoácidos favorables para el crecimiento de la bacteria *B. cereus*. (OE1)
- La identificación y caracterización de la bacteria *B. cereus* realizado con la técnica de Maldi-tof y PCR, coincidió en un 100 % con la cepa aislada obtenida del tracto digestivo del camarón. (OE1)
- El análisis estadístico del diseño experimental reveló que existe una mayor actividad enzimática al trabajar bajo condiciones de pH y concentración de sustrato igual a 8 y 1,5 g/L de harina de cabezas y cuellos de pollo, respectivamente. (OE1)
- El mayor valor de actividad enzimática se generó en la etapa de crecimiento de la bacteria *B. cereus*. (OE1)
- La actividad enzimática se incrementó al atravesar una columna de filtración de resina Sephadex G-25, con un valor igual a 55,01 [U/mL]. (OE1)
- El perfil de electroforesis determinó fracciones enzimáticas con tamaños moleculares que se encuentran entre 14,3 y 66 kDa. (OE1)
- Fue posible aislar una bacteria aerobia del ambiente del laboratorio de Bioprocesos (DECAB), con la utilización de gelatina bovina como sustrato. El microorganismo aislado se identificó como *Bacillus subtilis*. (OE1)
- La bacteria aislada metabolizó con mayor facilidad la torta de soya y harina de pluma a la concentración del 1 % en ambos casos, por lo que produjo la mayor actividad enzimática en estos medios ricos en proteína. La actividad azocaseinolítica en la pluma fue de  $6,75 \pm 0,38$  U/mL y para caseína fue de  $81,63 \pm 0,96$  U/mL, mientras que para la torta de soya dio como resultado  $8,54 \pm 0,16$  U/mL en azocaseína y  $83,12 \pm 0,12$  U/mL en caseína. (OE1)
- La producción máxima de proteasas en la torta de soya y harina de pluma se alcanzó a los 4 días tanto en el método con azocaseína como con caseína. (OE1)
- El proceso de disrupción celular no presentó una diferencia estadísticamente significativa en la producción de proteasas, se encontró que *Bacillus subtilis* presentó mayor cantidad de enzimas exógenas que endógenas. (OE1)



- Se logró purificar el extracto enzimático obtenido a partir de *Bacillus subtilis* en harina de pluma y torta de soya con la columna Sephadex G-25 y Sephadex G-100. En este estudio se obtuvo un incremento de actividad azocaseinolítica y caseinolítica de 8,85 U/mL y 83.71 U/mL a 10,91 U/mL y 90 U/mL para torta de soya respectivamente, mientras que para harina de pluma fue de 7,40 U/mL y 83,10 U/mL a 11,86 U/mL y 91,7 U/mL respectivamente. (OE1)
- Las fracciones con mayor actividad enzimática para harina de pluma y torta de soya presentaron varias bandas en el gel de electroforesis, lo que representa a diferentes enzimas con distintos tamaños moleculares. (OE1)
- Al fraccionar los hidrolizados con actividad antioxidante, concentraron la actividad en la fracción más pequeña lo que concuerda con la bibliografía que indica que al fraccionar esto ocurre tanto para actividad antioxidante como con la actividad antihipertensiva, el problema es que el proceso es largo y costoso, por lo que actualmente escalarlo a un proceso industrial no resultaría conveniente, esto porque aunque en menor proporción, las fracciones de los tamaños más grandes también tienen actividad y además proteínas y péptidos grandes, que son importantes nutrientes para los organismos animales. (OE3)
- Al hidrolizar torta de palmiste, el pH tuvo un mayor efecto que la temperatura en los procesos de hidrólisis. Las mejores condiciones de pH y temperatura en el proceso de hidrólisis enzimática de la torta de palmiste con el extracto enzimático fueron 8 y 60 °C, respectivamente, y se alcanzó un grado de hidrólisis de 51,43 %. (OE1)
- El hidrolizado peptídico de torta de palmiste tuvo un valor de actividad antioxidante de 6,69 mg de ácido ascórbico Eq/g proteína. (OE1)
- Los pesos moleculares del hidrolizado peptídico de torta de palmiste se encontraron en un rango entre 20 kDa y 200 kDa. (OE3)
- La toxicidad que presentó el hidrolizado de torta de palmiste fue a una concentración letal media (LC50) de 0,239 mg/mL, lo que significa que el hidrolizado es tóxico, uno de los problemas al hidrolizar proteínas es que la ruptura de enlaces, en ciertos casos puede dar lugar a la formación de péptidos tóxicos. (OE4)
- La combinación de pH y temperatura tienen influencia sobre el grado de hidrólisis de hidrolizados peptídicos de harina de sangre bovina, utilizando el extracto enzimático resultante de la fermentación de torta de soya con *B. subtilis*. (OE1)
- La actividad antioxidante es directamente proporcional al grado de hidrólisis de la harina de sangre bovina, ya que se encontró que los extractos peptídicos más hidrolizados presentaron una mayor actividad antioxidante debido a que se tienen aminoácidos más expuestos por la descompactación de las proteínas. (OE2)
- Los hidrolizados peptídicos de harina de sangre bovina presentaron una marcada actividad antifúngica frente a *Fusarium keratoplasticum* ATCC 36031 razón por la cual podrían representar una fuente para el desarrollo de tratamientos contra infecciones con este hongo. (OE2)
- Mediante modelo biológico seleccionado (*Danio rerio*), se identificó que la Dosis Máxima Tolerada (DMT) del hidrolizado peptídico optimizado es de 100 µg/mL, lo cual permitiría formular protocolos que identifiquen la aplicabilidad de estos hidrolizados en el desarrollo de productos en la industria alimentaria, como antioxidante o como aditivo para prevenir la infección de *Fusarium keratoplasticum* en la producción de camarón (OE4).





#### PRODUCTOS:

- **Artículo enviado para revisión:** "*Toxicological evaluation of peptide hydrolysates from bovine blood meal with Antioxidant and Antifungal and Activities*"; Lucía Buitrón, Alisson Sisa, Roberto Arévalo, Eugenia Peñaherrera, Mauricio Mosquera; LWT- Food Science and Technology (Indexado SCOPUS, Q1); ISSN: 00236438, 10961127; febrero 2023.
- **Artículo enviado para revisión:** "*Novel approaches for the production of proteolytic enzymes. Evaluation of by products from agricultural, livestock and fishing industries as culture media*"; Alisson Sisa, Cristina Sotomayor, Roberto Arévalo, Lucía Buitrón, Joaquín Gómez Estaca, Óscar Martínez Álvarez, Mauricio Mosquera; Food Chemistry (Indexado SCOPUS, Q1); ISSN: 03088146, 18737072; febrero 2023.
- **Artículo enviado para revisión:** "*Comparison of Antioxidant Activity in Peptide Fractions obtained from the Hydrolysis of Collagen Extracted from Meager Spines (Sciaenops ocellatus)*"; Salazar Paola, Mosquera Mauricio; Enfoque UTE (Latindex); ISSN: 1390-6542; febrero 2023.
- **Paper de titulación de Ingeniera Agro Industrial:** "*Evaluación del efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo de una bacteria aerobia para la producción de enzimas proteolíticas*"; Sisa Allayca Alisson Daniela; URL: <https://biblioteca.epn.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=71971>; noviembre 2018.
- **Proyecto de titulación de Ingeniero Agro Industrial:** "*Obtención de enzimas proteolíticas producidas por la bacteria bacillus cereus, presente en intestinos de camarón (penaeus vannamei), con el uso de cabezas de pollo como sustrato*"; Hidalgo Vinuesa David Antonio; URL: <https://biblioteca.epn.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=72324>; febrero 2019.
- **Paper de titulación de Ingeniero Agro Industrial:** "*Evaluación de la actividad antioxidante y toxicidad de un hidrolizado peptídico obtenido a partir de torta de palmiste*"; Lozano Ortiz Bryan Miguel; URL: <https://biblioteca.epn.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=73832>; enero 2020.
- **Tesis de Magister en Biociencias aplicada con mención en Biodescubrimiento:** "*Evaluación de las actividades: antioxidante y antibacteriana de hidrolizados peptídicos de harina de sangre bovina y su valoración toxicológica en Danio rerio*"; Buitrón Sierra Lucía de los Ángeles; tesis presentada en febrero 2023.
- **Póster presentado en evento:** "*Isolation and identification of a bacteria from shrimp intestines (Penaeus vannamei), to obtain proteolytic enzymes*"; Mauricio Mosquera; Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA XII; Portugal – Algarve; julio 2019.
- **Póster presentado en evento:** "*Evaluation of three agroindustrial by products for the production of proteolic enzymes with "Bacillus subtilis" as a culture medium*"; Alisson Sisa; Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA XII; Portugal – Algarve; julio 2019.

#### 4. LIQUIDACIÓN ECONÓMICA:

El monto asignado al Proyecto de Investigación Junior PIJ-16-12 fue de \$ 89.556,32 USD (ochentainueve mil quinientos cincuenta y seis dólares americanos, con 32/100), y se ejecutaron \$81.558,46 USD (ochenta y un mil quinientos cincuenta y ocho dólares americanos, con 46/100), conforme al detalle emitido por la Unidad de Gestión de Investigación y Proyección Social del Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Vinculación, que se adjunta a la presente Acta y forma parte integrante de la misma.

## 5. FINALIZACIÓN:

Con la presente Acta se declara finalizado y cerrado el Proyecto de Investigación Junior PIJ-16-12 "Análisis de la toxicidad de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas obtenidas a partir de los subproductos de la industria agropecuaria".

Para constancia de lo ejecutado y por estar de acuerdo con el contenido de la presente Acta, las partes libre y voluntariamente suscriben la misma, en tres ejemplares de igual contenido, tenor y valor legal.

Dado en la ciudad de Quito, D.M. a los trece días del mes de abril del año dos mil veintitrés.



Dra. Alexandra Alvarado  
Vicerrectora de Investigación,  
Innovación y Vinculación

sp/cr



Dr. Mauricio Mosquera  
Director del Proyecto  
PIJ-16-12

Recibido  
17-04-2013

