



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Food**UPV  
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos  
(FoodUPV)

UTILIZACION DE ENZIMAS Y ULTRASONIDOS PARA  
OBTENER HIDROLIZADOS RICOS EN PÉPTIDOS  
BIOACTIVOS A PARTIR DE RIÑONES DE BOVINO

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Lagos Soto, Alejandra María

Tutor/a: Toldrá Vilardell, Fidel

Cotutor/a externo: Gallego Ibáñez, Marta

Director/a Experimental: Mora Soler, Leticia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# UTILIZACIÓN DE ENZIMAS Y ULTRASONIDOS PARA OBTENER HIDROLIZADOS RICOS EN PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE RIÑONES DE BOVINO

Alejandra Maria Lagos Soto<sup>1</sup>, Marta Gallego Ibáñez<sup>1</sup>, Leticia Mora Soler<sup>1</sup>, Fidel Toldrá Vilardell<sup>1</sup>.

## RESUMEN

Este estudio evaluó el uso aislado o secuencial de las enzimas pepsina (Pep) y alcalasa (Alc), y su combinación con ultrasonidos (US), para la obtención de hidrolizados de riñón bovino ricos en péptidos bioactivos. Se evaluó el grado de hidrólisis, el perfil de proteínas mediante electroforesis en gel, así como la actividad antioxidante y la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa mediante ensayos *in vitro*. Los resultados mostraron que Alc, Alc+US y Alc+Pep presentaron la mayor hidrólisis proteica, pero la actividad antioxidante de los hidrolizados varió según el ensayo utilizado. En cuanto al potencial antidiabético, solo las muestras Pep, Pep+US y Alc+Pep presentaron inhibición de  $\alpha$ -amilasa, mientras que estas tres muestras y Alc+US mostraron inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, destacando Pep+US que mostró valores mayores al 70 % en ambos ensayos. El análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) reveló diferencias en los perfiles peptídicos según los tratamientos enzimáticos, principalmente entre las muestras tratadas con pepsina y Pep+Alc. Las fracciones de RP-HPLC no mostraron inhibición de  $\alpha$ -amilasa, pero alcanzaron valores de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa mayores al 60 % en todas las muestras. Así, este estudio evidencia el potencial de los hidrolizados de riñón bovino como fuente de péptidos con capacidad antioxidante y antidiabética, siendo de interés en el desarrollo de alimentos funcionales y dando un valor añadido a este subproducto.

Palabras clave: subproductos cárnicos, hidrólisis enzimática, ultrasonidos, péptidos, actividad antioxidante, potencial antidiabético.

## RESUM

Aquest estudi va avaluar l'ús aïllat o seqüencial dels enzims pepsina (Pep) i alcalasa (Alc), i la seua combinació amb ultrasons (US), per a l'obtenció d'hidrolitzats de renyó boví rics en pèptids bioactius. Es va avaluar el grau d'hidròlisi, el perfil de proteïnes mitjançant electroforesi en gel, així com l'activitat antioxidant i la inhibició dels enzims  $\alpha$ -amilasa i  $\alpha$ -glucosidasa amb assajos *in vitro*. Els resultats van mostrar que Alc, Alc+US i Alc+Pep van presentar la major hidròlisi proteica, però l'activitat antioxidant dels hidrolitzats va variar segons l'assaig utilitzat. Respecte al potencial

---

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España.

antidiabètic, només les mostres Pep, Pep+US i Alc+Pep van presentar inhibició de  $\alpha$ -amilasa, mentre que aquestes tres mostres i Alc+US van mostrar inhibició de  $\alpha$ -glucosidasa, destacant Pep+US que va mostrar valors majors al 70 % als dos assajos. L'anàlisi per cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC) va revelar diferències en els perfils peptídics segons els tractaments enzimàtics, principalment entre les mostres tractades amb pepsina i Pep+Alc. Les fraccions de RP-HPLC no van mostrar inhibició de  $\alpha$ -amilasa però van aconseguir valors d'inhibició de  $\alpha$ -glucosidasa majors al 60 % en totes les mostres. Així, aquest estudi evidencia el potencial dels hidrolitzats de renyó boví com a font de pèptids amb capacitat antioxidant i antidiabètica, sent d'interés en el desenvolupament d'aliments funcionals i donant un valor afegit a aquest subproducte.

Paraules clau: subproductes càrnics, hidròlisi enzimàtica, ultrasons, pèptids, activitat antioxidant, potencial antidiabètic.

## **ABSTRACT**

This study evaluated the isolated or sequential use of the enzymes pepsin (Pep) and alcalase (Alc), and their combination with ultrasounds (US), for obtaining bovine kidney hydrolysates rich in bioactive peptides. The degree of hydrolysis, the protein profile obtained by gel electrophoresis, as well as the antioxidant activity and the inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes through *in vitro* assays were assessed. The results showed that Alc, Alc+US, and Alc+Pep exhibited the highest protein hydrolysis, but the antioxidant activity of the hydrolysates varied depending on the assay used. Regarding the antidiabetic potential, only the samples Pep, Pep+US, and Alc+Pep showed  $\alpha$ -amylase inhibition, while these three samples and Alc+US showed  $\alpha$ -glucosidase inhibition, highlighting Pep+US that achieved values above 70 % in both assays. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis revealed differences in the peptide profiles depending on the enzymatic treatments, mainly between the pepsin-treated and Pep+Alc samples. The RP-HPLC fractions did not show  $\alpha$ -amylase inhibition, but reached  $\alpha$ -glucosidase inhibition values greater than 60 % in all samples. Thus, this study shows the potential of bovine kidney hydrolysates as a source of peptides with antioxidant and antidiabetic activities, being of interest in the development of functional foods and giving added value to this by-product.

Keywords: meat by-products, enzymatic hydrolysis, ultrasounds, peptides, antioxidant activity, antidiabetic potential.

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria cárnica genera una considerable cantidad de desechos y subproductos que, si no se manejan adecuadamente, pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente (Toldrá et al., 2021). Se estima que aproximadamente el 50 % del peso total de un animal bovino está compuesto por subproductos, incluyendo coproductos que son los que se destinan al consumo humano (Lafarga et al., 2017). Entre ellos están los órganos, como pulmón, cerebro, riñón e hígado, que se consumen tradicionalmente en algunos países, pero en otros son utilizados para fines de bajo valor (Toldrá et al., 2012). Por ello, en la actualidad se está estudiando el valioso potencial económico y funcional que tienen estos subproductos, no solo para darles un valor añadido, sino también para reducir la carga ambiental de la industria cárnica, ofreciendo una solución sostenible para la gestión de residuos y contribuyendo a una economía circular (Toldrá et al., 2021).

Los órganos son fuente de vitaminas, minerales y proteínas de alto valor biológico, por tanto, presentan un potencial funcional interesante (Mullen y Álvarez, 2015). Sin embargo, también pueden utilizarse para la obtención de hidrolizados proteicos, lo que implica el uso de procesos enzimáticos para descomponer las proteínas en péptidos. Ello puede permitir la obtención de ingredientes funcionales o hidrolizados ricos en péptidos bioactivos a través de procesos biotecnológicos. Este proceso no solo mejora la digestibilidad y la absorción de las proteínas, sino que también puede generar péptidos con propiedades bioactivas significativas (Toldrá et al., 2016).

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas que tienen un impacto positivo en la salud más allá de su valor nutricional básico. Varios subproductos cárnicos, como huesos de jamón curado, pulmones, hígado o sangre, se han descrito como fuentes de péptidos con propiedades antihipertensivas, antioxidantes, antitrombóticas o antimicrobianas, entre otras (Toldrá et al., 2023). Además, diversos estudios han reportado la obtención de hidrolizados proteicos a partir de órganos mediante el uso de proteasas comerciales como la tripsina, alcalasa o flavourzima, mostrando una notable capacidad para generar péptidos bioactivos (Lafarga et al., 2017; Toldrá et al., 2023). Los tratamientos enzimáticos pueden combinarse también con ultrasonidos para mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis, siendo una tecnología no térmica, segura y sostenible que puede ofrecer aplicaciones innovadoras en la obtención de péptidos bioactivos (Ozuna et al., 2015).

El objetivo de este estudio fue utilizar riñones de bovino para la obtención de hidrolizados ricos en péptidos bioactivos, empleando procesos de hidrólisis sostenibles. Se utilizaron las enzimas pepsina y alcalasa, tanto de forma aislada

como secuencial, así como su combinación con ultrasonidos, para optimizar la hidrólisis proteica y maximizar la producción de péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes y potenciales efectos antidiabéticos. Para ello, se evaluó el grado de hidrólisis, el perfil proteico mediante electroforesis en gel, así como la actividad antioxidante y la capacidad inhibidora de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa mediante ensayos *in vitro*. Además, se empleó cromatografía líquida de alta resolución para caracterizar los perfiles peptídicos y fraccionar los hidrolizados, identificando las fracciones con mayor bioactividad.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales y reactivos**

Para la obtención de los hidrolizados se utilizaron 4 riñones de bovino de raza conjunto mestizo, con edad de 12-18 meses, procedentes de Ganados Mayo Gaibiel, S.L. (Castellón, España). Las enzimas utilizadas para las hidrólisis fueron la Alcalasa®Pure 2.4L, proteasa con actividad de 2,4 U/g (Novozymes S/A, Bagsvaerd, Dinamarca) y pepsina de mucosa gástrica porcina con actividad de 4,552 U/g (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE.UU.).

Los reactivos utilizados para la determinación del grado de hidrólisis fueron: disodio tetraborato decahidratado (Panreac Química, S.A.U., Barcelona, Spain); dodecilsulfato de sodio (SDS), o-ftalaldehído 97% (OPA), ditioneitol (DTT) y serina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.); etanol absoluto (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España).

Los reactivos utilizados en los ensayos de actividad antioxidante fueron: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), hidroxitolueno butilado (BHT), ferrocianuro de potasio, ácido tricloroacético (TCA), cloruro férrico, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (APPH), ácido ascórbico, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), fluoresceína, triptófano y ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.).

Para evaluar la actividad antidiabética se utilizó: enzima  $\alpha$ -amilasa de páncreas de porcino, acarbosa,  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopironidasa (p-NPG) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, EE. UU.); 2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido (CNP3) (SPINREACT, Girona, España).

Para la cromatografía líquida de alta resolución se empleó ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich Co., Darmstadt, Alemania) y acetonitrilo (ACN) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España).

## 2.2. Caracterización y obtención de hidrolizados de riñón

Los riñones de bovino fueron lavados y limpiados de tejido adiposo, para después ser troceados y triturados en una picadora. Se midió la humedad utilizando un analizador halógeno de humedad (HB43, Mettler Toledo, Suiza), y el pH utilizando un medidor de pH portátil (HI 99163, Hanna Instruments Inc., Hoonsocket, EE.UU.). También se determinó el porcentaje de proteína mediante el método Dumas (AOAC, 1992). El riñón triturado se diluyó con agua bidestilada hasta una concentración de 1 g/mL y se homogenizó en un Stomacher® (IUL, S.A., Barcelona, España) durante 5 min en frío.

Los hidrolizados de riñón se obtuvieron mediante distintos tratamientos con alcalasa y pepsina. Estas enzimas se añadieron de forma aislada, de forma secuencial, o mediante la combinación de enzima y aplicación de ultrasonidos (US). Para ello, las muestras de riñón homogenizadas se traspasaron a un reactor con agitación (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania) y se llevaron a cabo las distintas hidrólisis enzimáticas según las condiciones indicadas en la Tabla 1. En los tratamientos enzimáticos combinados con US se utilizó la sonda de ultrasonidos modelo VCX 750 (Sonics and Materials Inc. Newtown CT. USA) a 20 kHz, en modo pulso “2 on /4 off”, y a una amplitud del 75%. Cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado.

**TABLA 1.** Condiciones de hidrólisis.

Muestra	Enzima	Proporción enzima	Tiempo	Temperatura	pH
Pep	Pepsina	1%	2h	37°C	2
Pep+US	Pepsina + Ultrasonidos	1%	2h	37°C	2
Alc	Alcalasa	2%	2h	65°C	8
Alc+US	Alcalasa + Ultrasonidos	2%	2h	65°C	8
Pep+Alc	Pepsina + Alcalasa	1% Pepsina; 2% Alcalasa	2h + 2h	37°C; 65°C	2; 8
Alc+Pep	Alcalasa + Pepsina	2% Alcalasa; 1% Pepsina	2h + 2h	65°C; 37°C	8; 2

### 2.3. Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) evalúa el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la hidrólisis de proteínas. El ensayo se llevó a cabo siguiendo el método OPA de Nielsen et al. (2001), donde la reacción del OPA con los grupos amino libres de los péptidos liberados se cuantifica espectrofotométricamente. Para ello, se preparó el reactivo OPA de la siguiente manera: 7,620 g de tetraborato de sodio decahidratado y 200 mg de SDS se disolvieron en 150 mL de agua bidestilada. Por otro lado, se disolvieron 160 mg de OPA en 4 mL de etanol, y esta solución se transfirió cuantitativamente a la solución anterior. Finalmente, se añadieron 176 mg de DTT a la solución y se completó con agua bidestilada hasta alcanzar 200 mL. Se utilizó serina como estándar, diluyendo 20 mg de serina en 200 mL de agua bidestilada.

Para la realización del ensayo, 270  $\mu$ L de OPA se mezclaron con 36  $\mu$ L del estándar (serina), blanco (agua bidestilada), o muestra (20 mg/mL). El GH se calculó siguiendo las ecuaciones (1), (2) y (3):

$$Serina - NH_2 = \frac{(OD\ muestra - OD\ blanco)}{(OD\ estandar - OD\ blanco)} \times 0,9516 \frac{meqv}{L} \times \frac{0,1 \times 100}{X \times P} \quad (1)$$

$$h = \frac{(Serina - NH_2 - \beta)}{\alpha} \quad (2)$$

$$GH (\%) = \frac{h}{htot} \times 100 \quad (3)$$

donde: P = % proteína; X = g muestra en 0,1 L; OD= Absorbancia;  $\beta=0,40$ ;  $\alpha=1,0$ ;  $htot= 7,6$ .

### 2.4. Electroforesis en gel

Los hidrolizados fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para separar las proteínas según su peso molecular (Laemmli, 1970). Para ello, las muestras fueron diluidas en tampón Laemmli hasta alcanzar una concentración de 10 mg/mL y desnaturalizadas a 95 °C durante 5 min. Un total de 20  $\mu$ L de cada muestra fue cargada en el gel. La electroforesis se realizó en un gel Bio-Rad al 12 % a 200 V durante 30 min. El gel fue fijado con 40 % de etanol y 10 % de ácido acético durante 1 h, teñido con azul de Coomassie por 1 h y posteriormente desteñido con agua bidestilada. El gel obtenido fue escaneado y los resultados fueron procesados y analizados con el programa ImageJ v.1.52 (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, EE.UU.) para obtener las imágenes de los perfiles proteicos.

## 2.5. Determinación de la actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de los hidrolizados se utilizaron los siguientes métodos: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), decoloración del catión radical (ABTS), actividad captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), según las metodologías descritas por Gallego et al. (2017). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 2.5.1. Método ORAC

Para el ensayo, 140  $\mu\text{L}$  de tampón sodio-fosfato (75 mM, pH 7,4) como control negativo, muestra (0,1 mg/mL) o triptófano (3  $\mu\text{M}$ ) como control positivo, se mezclaron con 70  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (200 nM). Tras una incubación de 15 min a 37°C, se añadieron 70  $\mu\text{L}$  de AAPH (80 mM) y se leyó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm, respectivamente, durante 100 min a intervalos de 1 min. Para ello se utilizó el lector de microplacas Clariostar-Plus (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemania).

Los cálculos para la determinación de ORAC implicaron la determinación del área bajo la curva (AUC) según la ecuación (4):

$$AUC = \sum_{i=0}^{100} \frac{F_i}{F_0} \quad (4)$$

donde:  $F_i$  = lectura cada minuto del  $t=1$  a  $t=100$  min y  $F_0$  = lectura a  $t=0$ .

Una vez obtenido el AUC, se calculó el valor neto de acuerdo a la ecuación (5):

$$AUC \text{ neto} = AUC \text{ muestra} - AUC \text{ blanco} \quad (5)$$

Finalmente, los resultados se expresaron como nmoles de equivalentes de trolox (TE) por mg de muestra, a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de una recta obtenida con el estándar trolox en un rango de 0 a 16  $\mu\text{M}$ .

### 2.5.2. Método ABTS

En el ensayo se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de tampón sodio-fosfato (pH 7,4) como control negativo, ácido ascórbico (4 mM) como control positivo o muestra (2 mg/mL), con 990  $\mu\text{L}$  de solución ABTS<sup>+</sup>, la cual fue preparada a partir de ABTS stock (7 mM) y tampón sodio-fosfato en relación 1/89. Tras agitar la mezcla e incubarla durante 6 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Cary60, Agilent Technologies, CA, EE.UU.). El porcentaje de inhibición se calculó según la ecuación (6):



$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs control negativo} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control negativo}} \times 100 \quad (6)$$

Finalmente, los resultados se expresaron como nmoles de TE por mg de muestra, a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de una recta obtenida con el estándar trolox en un rango de 0 a 2 mM.

### **2.5.3. Método DPPH**

El método consistió en añadir 100 µL de etanol como control negativo, BHT (2 mg/mL) como control positivo, o muestra (50 mg/mL) a 125 µL de solución de DPPH (0,02 % en etanol) y 500 µL de etanol. La mezcla se agitó en un vórtex y se dejó reposar durante 1 h en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 1000xg durante 1 min para evitar turbidez en las muestras y finalmente, se midió la absorbancia a 517 nm usando el espectrofotómetro. Valores bajos de absorbancia indican la capacidad de la muestra para reducir el radical DPPH y, por tanto, una alta actividad antioxidante. El porcentaje de DPPH se calculó a partir de la ecuación (7):

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs control negativo} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control negativo}} \times 100 \quad (7)$$

Finalmente, los resultados se expresaron como nmoles de TE por mg de muestra, a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de una recta obtenida con el estándar trolox en un rango de 0 a 0,3 mM.

### **2.5.4. Método FRAP**

Para el ensayo, se mezclaron 80 µL de muestra (20 mg/mL), tampón fosfato (0,2 M, pH 6,6) como control negativo, o BHT (2 mg/mL) como control positivo, con 80 µL de tampón fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 80 µL de ferrocianuro potásico (10 mg/mL). La mezcla se incubó durante 20 min a 50°C y después se añadieron 80 µL de TCA (100 mg/mL) y se centrifugó a 200xg y 8°C durante 10 min. Se tomaron 250 µL del sobrenadante y se mezclaron con 250 µL de agua bidestilada y 50 µL de cloruro férrico (1 mg/mL). Tras una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 700 nm utilizando el espectrofotómetro UV-visible. Valores altos de absorbancia indican un alto poder reductor y, por tanto, alta actividad antioxidante. Los resultados se expresaron como nmoles de TE por mg de muestra a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida de una curva estándar realizada con trolox a concentraciones de 0 a 2 mM.

## 2.6. Determinación de la actividad antidiabética

El potencial antidiabético de los hidrolizados se evaluó, por triplicado, mediante los ensayos de inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

### 2.6.1. Ensayo de inhibición de la $\alpha$ -amilasa

Este ensayo fue realizado mediante la adición de 80  $\mu$ L de enzima  $\alpha$ -amilasa (0,5 g/mL en tampón fosfato 20 mM, pH 6,8 con 6 mM NaCl) a 60  $\mu$ L de muestra (0,5 g/mL), agua bidestilada como control negativo, o acarbosa (2 mg/mL) como control positivo. Tras una incubación de 10 min a 37°C, se adicionaron 60  $\mu$ L del sustrato CNPG3 y 100  $\mu$ L de tampón fosfato, y se incubó 5 min a 37°C. Después, se procedió a la lectura de la absorbancia a 405 nm en el lector de microplacas Clariostar-Plus. El porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa se calculó según la ecuación (8):

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{\text{Abs control negativo} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control negativo}} \right) \times 100 \quad (8)$$

### 2.6.2. Ensayo de inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa

Para el ensayo se mezclaron 50  $\mu$ L de muestra (0,5 g/mL), tampón sodio-fosfato (0,1 M, pH 6,8) como control negativo, o acarbosa (5 mg/mL) como control positivo con 25  $\mu$ L de enzima  $\alpha$ -glucosidasa (0,5 U/mL en tampón sodio-fosfato) y se procedió a una incubación de 5 min a 37°C. Después, se adicionaron 25  $\mu$ L de p-NPG (1,25 mM en tampón sodio-fosfato), y tras una incubación de 20 min a 37°C, se determinó la absorbancia a 405 nm en el lector de microplacas Clariostar-Plus. El porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa se determinó según la ecuación (8).

## 2.7. Cromatografía líquida de alta resolución por fase reversa

Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución por fase reversa (RP-HPLC) para la obtención de los perfiles peptídicos de las muestras. Para ello, los hidrolizados a una concentración de 100 mg/mL fueron inyectados automáticamente en un equipo HPLC 1100 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) con una columna de fase reversa Symmetry C18 (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm; Walters Co., Milford, MA, EE.UU.). La fase A fue 0,1 % de TFA en agua, y la fase B fue una mezcla 60:40:0,085 % de ACN:agua bidestilada:TFA. Ambas fases fueron filtradas y desgasificadas antes de acondicionar el equipo. Las muestras se inyectaron bajo las siguientes condiciones cromatográficas: flujo de 1 mL/min, inyección de 100  $\mu$ L de muestra, y un gradiente de elución consistente en 5 min pasando de 0 % a 2 % de fase B, de 2 % a 45 % de fase B durante 45 min, y de 45 % a 100 % de fase B en 3 min.

Además, los hidrolizados que presentaron actividad antidiabética fueron fraccionados siguiendo las mismas condiciones de RP-HPLC. Se recolectaron automáticamente fracciones de 2 mL, se agruparon cada 5 y se liofilizaron. Posteriormente, cada grupo de fracciones se resuspendió en 300  $\mu$ L de agua bidestilada para ser concentrado y seguidamente medir la actividad antidiabética mediante los ensayos de inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

## **2.8. Análisis estadístico**

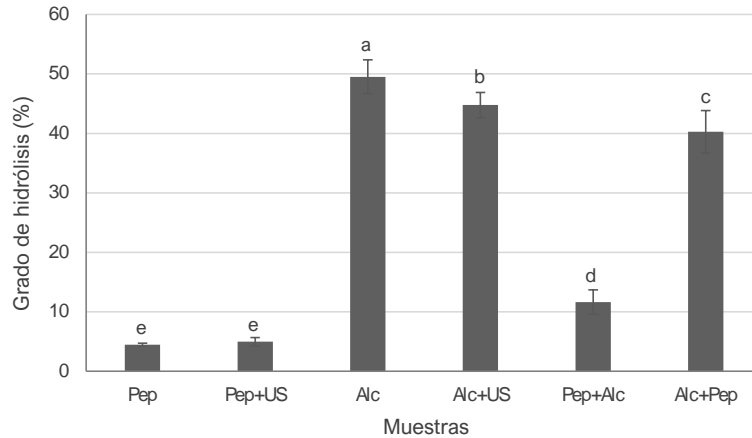
Para analizar los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA one-way) ( $P < 0,05$ ) con prueba de Fisher para determinar las diferencias significativas entre las muestras. Para ello se utilizó el software OriginPro (versión 2024b. OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.)

## **3. DISCUSION DE RESULTADOS**

### **3.1. Caracterización de los hidrolizados de riñón**

Las muestras de riñón de bovino presentaron un contenido de humedad de  $77,8 \pm 0,9$  % y un contenido de proteína de  $17,60 \pm 0,05$  %, lo que indicó su valor nutricional como fuente proteica. El pH registrado fue de  $6,08 \pm 0,05$ , siendo modificado según las condiciones óptimas de cada enzima para obtener los hidrolizados.

El grado de hidrólisis (GH) evalúa la extensión en la que las proteínas han sido descompuestas en péptidos y aminoácidos. Los resultados de GH de los hidrolizados obtenidos mediante los diferentes tratamientos enzimáticos y US se muestran en la Figura 1. Las muestras Pep y Pep+US presentaron el menor valor de GH (alrededor del 5 %), mientras que Alc y Alc+US presentaron valores de  $50 \pm 3$  % y  $45 \pm 2$  %, respectivamente. Estos resultados podrían atribuirse a la especificidad de las enzimas utilizadas. La pepsina hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en el entorno de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano, mientras que la alcalasa es una proteasa con amplia especificidad, capaz de hidrolizar una mayor variedad de enlaces peptídicos, lo que explica su mayor eficiencia en comparación con la pepsina (Tacias-Pascacio et al., 2020). Sin embargo, la aplicación de US habría afectado negativamente la actividad de la alcalasa, lo que podría deberse a una desnaturalización de la enzima o a cambios estructurales en las proteínas que dificultarían la acción enzimática (Abadía-García et al., 2016).



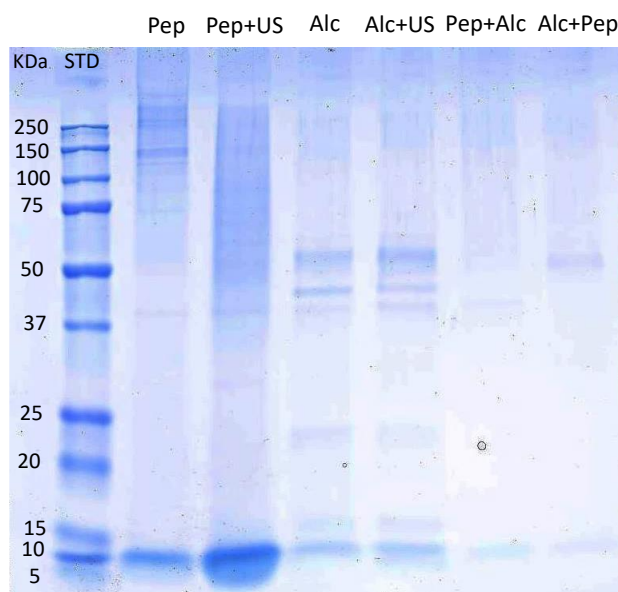
**FIGURA 1.** Grado de hidrólisis de los hidrolizados. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ).

También se observó que la combinación secuencial y el orden de adición de enzimas influyeron significativamente en el GH obtenido. La muestra Pep+Alc presentó un GH de  $12 \pm 2$  %, mientras que Alc+Pep alcanzó un  $40 \pm 4$  %. Este descenso se atribuiría de nuevo a la especificidad enzimática. La pepsina, que actúa en condiciones ácidas, corta las proteínas en fragmentos específicos, mientras que la alcalasa hidroliza de manera menos específica en un rango de pH básico. Así, cuando se utiliza primero la alcalasa, la cual tiene una actividad más potente y generalizada, se podrían generar fragmentos más accesibles, favoreciendo la acción posterior de la pepsina y resultando en un mayor GH. Además, cabe destacar que los valores de GH en las hidrólisis secuenciales fueron menores que con el uso de Alc o Alc+US, especialmente en el caso de Pep+Alc. Varios estudios han reportado procesos de hidrólisis más potentes tras hidrólisis enzimáticas secuenciales que aisladas (Carrera-Alvarado et al., 2023; Ozturk-Kerimoglu et al., 2023), pero ello dependerá de las enzimas utilizadas, condiciones de hidrólisis, así como la materia prima inicial. En este estudio se observó que el uso aislado o secuencial de alcalasa y pepsina, así como el orden de adición de las enzimas y su combinación con US, impactaron notablemente en la eficiencia de la hidrólisis de riñón bovino, siendo Alc, Alc+US y Alc+Pep los tratamientos que permitieron una mayor fragmentación proteica.

### 3.2. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel de las muestras se muestra en la Figura 2. El hidrolizado Pep presentó diversas bandas correspondientes principalmente a tamaños moleculares de 100-250 kDa y 10-15 kDa, mientras que Pep+US mostró un mayor rango de proteínas (50-250 kDa) así como una banda más intensa en 5-10 kDa. Ello

indicaría, que a pesar de que los valores de GH de ambas muestras fue similar (Figura 1), la aplicación de US podría potenciar la actividad enzimática y generación de fragmentos proteicos (Subhedar y Gogate, 2013). Las muestras Alc y Alc+US presentaron bandas correspondientes a tamaños moleculares medianos (20-50 kDa) y pequeños (10-15 kDa), lo que mostraría la eficacia de esta enzima en la degradación de proteínas grandes debido a su amplia especificidad y eficiencia en la ruptura de enlaces peptídicos (Tacias-Pascacio et al., 2020), tal y como se comentó anteriormente. Por otro lado, las muestras tratadas con combinaciones de pepsina y alcalasa mostraron bandas de menor intensidad, con predominancia de proteínas de tamaños moleculares medianos y pequeños. Esto sugiere una hidrólisis extensiva, resultando en una gran variedad de fragmentos proteicos, especialmente en el caso de Alc+Pep, lo que coincide con los resultados de GH.



**FIGURA 2.** Electroforesis en gel SDS-PAGE de los hidrolizados.

### **3.3. Bioactividad de los hidrolizados**

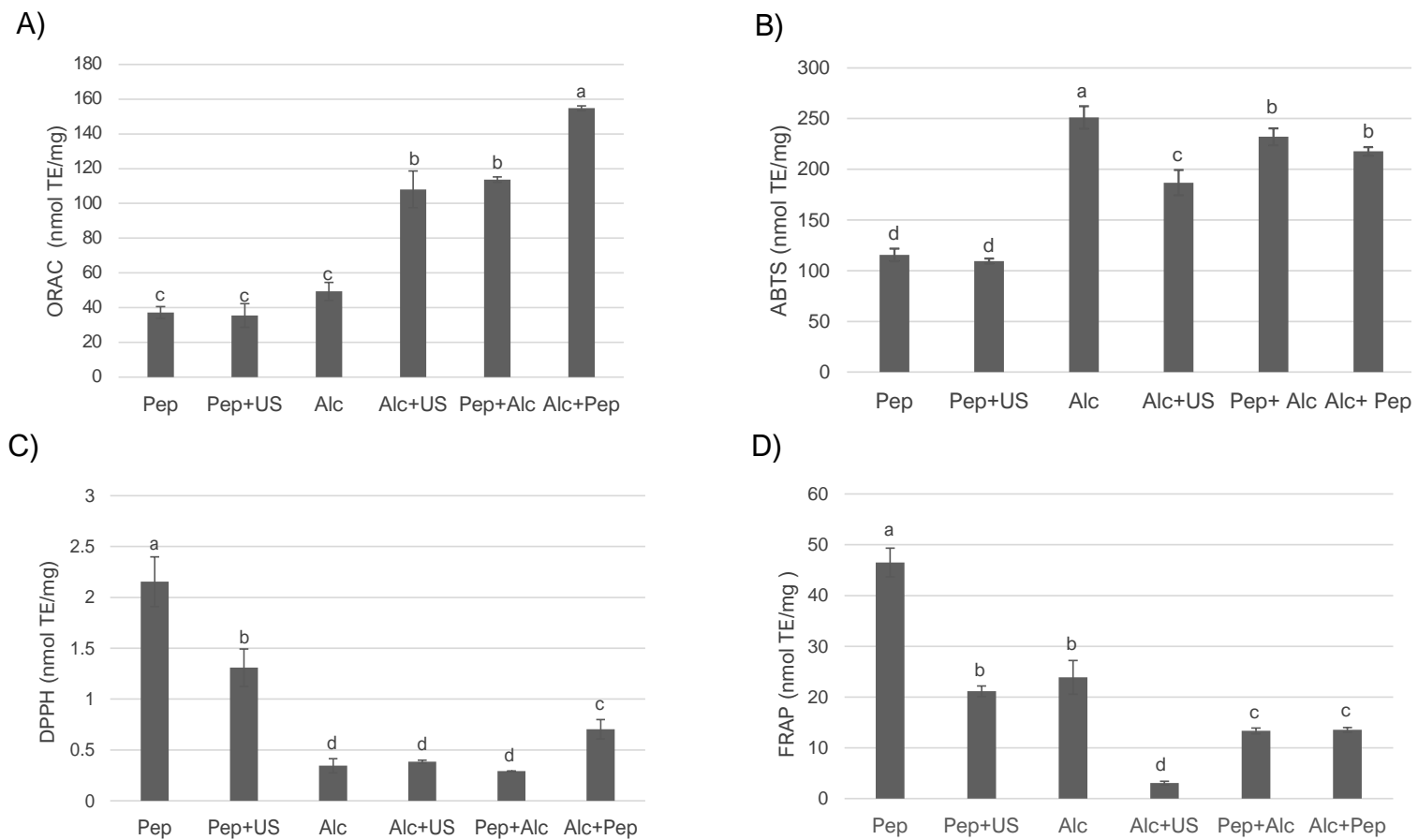
#### **3.3.1. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los hidrolizados se evaluó mediante los ensayos ORAC, ABTS, DPPH y FRAP, ya que el uso de distintos métodos es necesario para caracterizar de forma más completa la actividad antioxidante de las muestras. Los sustratos, las condiciones de reacción, la cinética y los métodos de cuantificación varían en cada ensayo, influyendo en el mecanismo predominante por el cual los péptidos antioxidantes ejercerán su efecto (Prior et al., 2005). La capacidad antioxidante de los péptidos está estrechamente relacionada con ciertas

características estructurales, como su masa molecular, composición de aminoácidos, secuencia y grado de hidrofobicidad. En particular, los péptidos de pequeño tamaño (3 a 6 aminoácidos, < 1000 Da) que contienen aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos en su secuencia tienden a mostrar un mayor potencial antioxidante (Huang et al., 2005; Zou et al., 2016).

Los resultados de actividad antioxidante de los hidrolizados se presentan en la Figura 3. Las muestras hidrolizadas con pepsina, tanto con como sin la aplicación de US, mostraron los menores valores de capacidad antioxidante en los ensayos ORAC y ABTS, sin diferencias significativas entre ambas muestras. Sin embargo, estos hidrolizados presentaron los valores más elevados en los ensayos DPPH y FRAP. Pep alcanzó valores de  $2,2 \pm 0,2$  nmol TE/mg en DPPH y  $47 \pm 3$  nmol TE/mg en FRAP, pero la actividad se redujo aproximadamente a la mitad con la aplicación de US. De manera similar, la muestra Alc+US mostró la menor actividad en FRAP ( $3,1 \pm 0,4$  nmol TE/mg), sugiriendo que los US podrían desnaturalizar proteínas y reducir la generación de péptidos antioxidantes, posiblemente debido a la pérdida de grupos funcionales (Su y Cavaco-Paulo, 2021). Los métodos DPPH y FRAP suelen correlacionarse bien con la hidrofobicidad de los péptidos (Liao et al., 2016), lo que sugiere que la aplicación de US podría influir significativamente en los péptidos con estas características. Sin embargo, los resultados muestran cierta variabilidad dependiendo del método empleado. Alc mostró el valor más alto de actividad antioxidante en ABTS ( $251 \pm 12$  nmol TE/mg), la cual también se redujo al combinarse con US. Sin embargo, la actividad en ORAC aumentó significativamente en Alc+US respecto a Alc. El estudio de Ma et al. (2018) reveló que el tratamiento con enzima y US podría modificar la estructura proteica, proporcionando más sitios de reacción a los radicales libres y con ello aumentando la actividad antioxidante.

Las muestras sometidas a hidrólisis secuencial mostraron una alta capacidad antioxidante tanto en los ensayos ORAC y ABTS. En ORAC, Pep+Alc alcanzó un valor de aproximadamente 110 nmol TE/mg, similar al de la muestra Alc+US, mientras que Alc+Pep mostró la mayor actividad ( $154,8 \pm 1,4$  nmol TE/mg). Resultados similares se observaron en el ensayo ABTS, donde las combinaciones de pepsina y alcalasa resultaron en niveles elevados de actividad antioxidante ( $232 \pm 8$  y  $217 \pm 4$  nmol TE/mg, respectivamente), superando a las muestras Pep, Pep+US y Alc+US.



**FIGURA 3.** Actividad antioxidante de los hidrolizados evaluada mediante los ensayos A) ORAC, B) ABTS, C) DPPH y D) FRAP. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ).

Estos resultados sugieren que la hidrólisis con alcalasa, con o sin US, así como la hidrólisis secuencial, podría favorecer la generación de péptidos con estructuras y características más afines a los mecanismos de reacción de los métodos ORAC y ABTS. La hidrólisis con pepsina generaría péptidos más apolares, que reaccionarían principalmente en los métodos DPPH y FRAP, mientras que los péptidos generados por alcalasa serían menos efectivos neutralizando radicales DPPH, posiblemente debido a su menor afinidad por péptidos hidrofóbicos (Zhu et al., 2008).

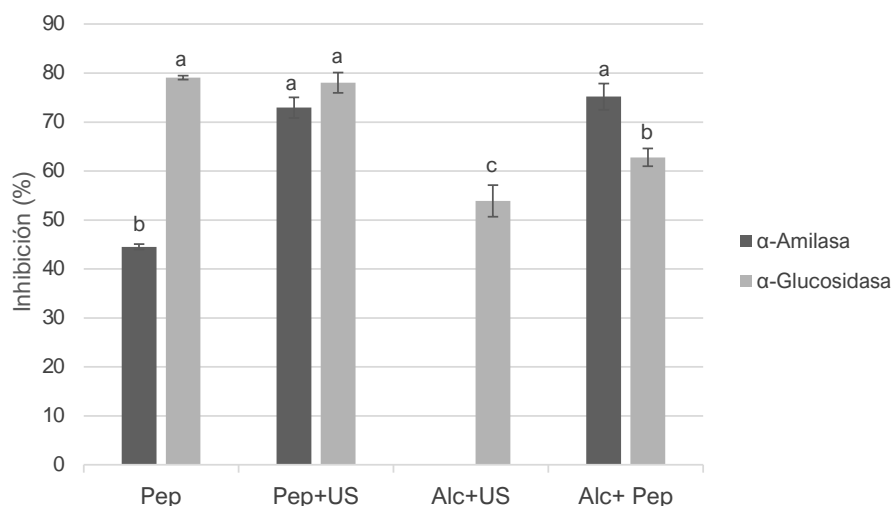
### **3.3.2. Potencial actividad antidiabética**

La capacidad de ciertos péptidos para inhibir las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa determina su potencial como agentes antidiabéticos. Estos péptidos pueden ayudar a controlar los niveles de glucosa en sangre al retardar la digestión de carbohidratos, lo que es prometedor para el desarrollo de alimentos funcionales o complementos nutricionales destinados a personas con diabetes o en riesgo de desarrollarla (Rivero-Pino et al., 2020).

Los resultados de actividad inhibidora de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de los diferentes hidrolizados, para determinar su potencial antidiabético, se muestran en la Figura 4. Solamente 3 hidrolizados (Pep, Pep+US y Alc+Pep) mostraron inhibición *in vitro* de la  $\alpha$ -amilasa. Se ha descrito que fragmentos proteicos inhibidores de  $\alpha$ -amilasa normalmente contienen triptófano, arginina y tirosina, y que los aminoácidos aromáticos inhiben la actividad de la  $\alpha$ -amilasa debido a su unión en el sitio activo de la enzima (Zhou et al., 2023). De esta forma, la hidrólisis enzimática con pepsina, la cual actúa sobre aminoácidos aromáticos, expondría más sitios de unión a la  $\alpha$ -amilasa, lo que explicaría los resultados obtenidos. La muestra Pep inhibió la  $\alpha$ -amilasa en un  $44,5 \pm 0,6$  %, aumentando significativamente hasta alrededor del 75 % al combinarse con US o en Alc+Pep. Además, se calculó el  $IC_{50}$  de estos hidrolizados, mostrando valores de 0,47 g/mL en el caso de Pep, y de 0,41 g/mL para las muestras Pep+US y Alc+Pep. Estos resultados sugieren que los US, así como la acción de la pepsina tras la hidrólisis con alcalasa, podrían mejorar la exposición de los sitios activos de los péptidos a esta enzima, potenciando su inhibición. Estudios previos también han demostrado que péptidos de bajo peso molecular ( $< 5$  kDa) generados por la acción de la pepsina serían responsables de gran parte de la actividad inhibidora de la  $\alpha$ -amilasa (Vilcacundo et al., 2017). Sin embargo, en la hidrólisis secuencial Pep+Alc, la alcalasa podría modificar los sitios de corte específicos generados previamente por la pepsina, impidiendo la unión a la enzima y por tanto su inhibición. Se ha reportado que la especificidad de corte de la pepsina generaría hidrolizados ricos en péptidos



inhibidores de  $\alpha$ -amilasa de forma más eficiente que otras enzimas como flavourzima, tripsina o neutrasa (Rivero-Pino et al., 2020; Zhou et al., 2023).



**FIGURA 4.** Inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa mostrada por los hidrolizados. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ).

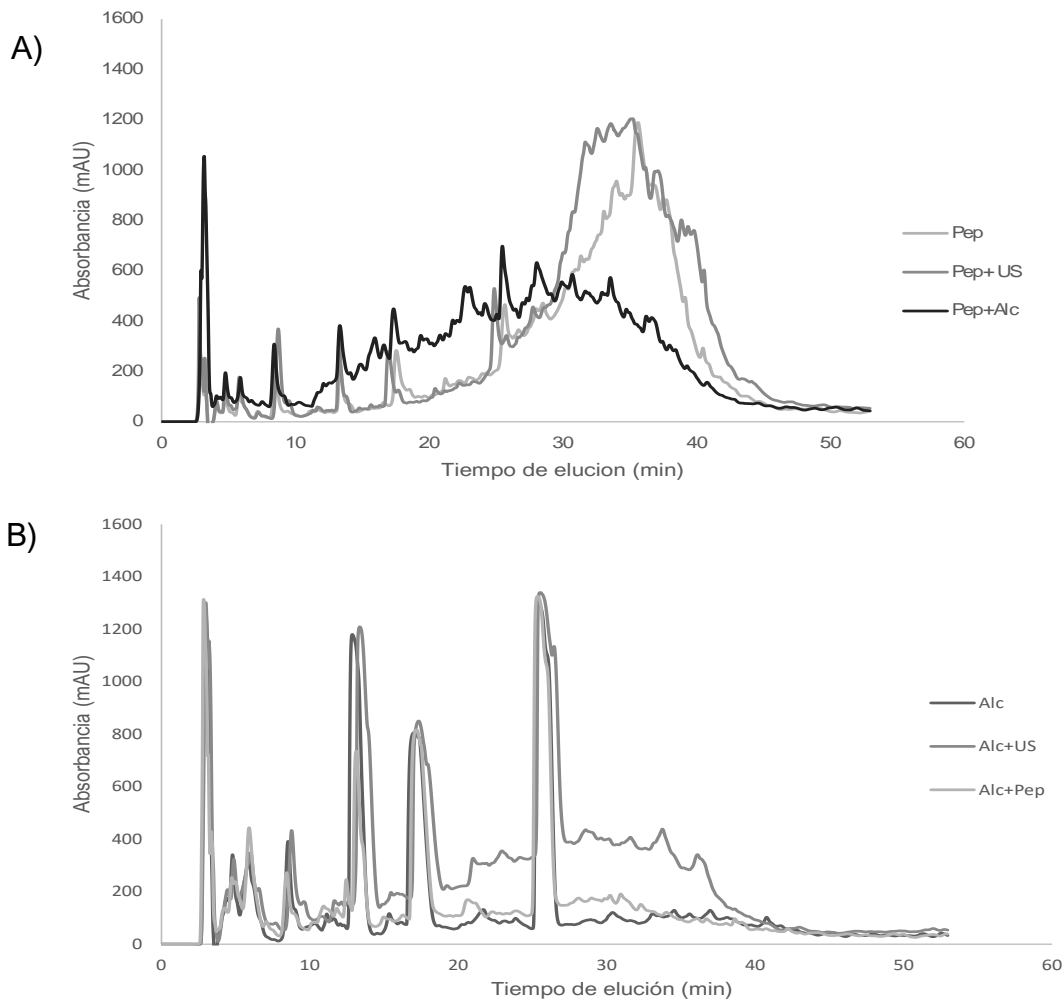
En cuanto a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, cuatro hidrolizados (Pep, Pep+US, Alc+Pep y Alc+US) mostraron actividad (Figura 4). La muestra Pep presentó el mayor valor ( $79,1 \pm 0,4\%$ ), sin diferencias significativas con Pep+US, sugiriendo que los US no afectarían la capacidad inhibidora de los péptidos generados. En cambio, la actividad se redujo en la muestra Alc+Pep hasta  $62,8 \pm 1,8 \%$ , indicando que la combinación de alcalasa y pepsina fue menos efectiva que el uso aislado de pepsina. Cabe destacar que la muestra Alc+US también presentó inhibición ( $54 \pm 3 \%$ ) mientras que Alc no mostró actividad, por lo que la combinación de la enzima con US sería crucial en la generación de péptidos con características específicas para inhibir la enzima. Algunos estudios han descrito la generación de péptidos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa en hidrolizados obtenidos con alcalasa y principalmente con tripsina (Arise et al., 2019; Connolly et al., 2014). La capacidad de inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa está estrechamente relacionada con la estructura y el tamaño de los péptidos, que generalmente constan de 2 a 20 aminoácidos (Rivero-Pino et al., 2020). Estos péptidos suelen presentar aminoácidos con cadenas laterales hidroxilo o básicas en el extremo N-terminal, prolina en el interior de la cadena, y alanina o metionina en el extremo C-terminal. Además, son predominantemente hidrofóbicos, conteniendo aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, como lisina, glutamina, prolina y arginina. La hidrofobicidad permite que los péptidos se unan estrechamente a la enzima, lo que es crucial para su efectiva inhibición (Ibrahim et al., 2018; Rodhi et al., 2023).

### 3.4. Perfiles peptídicos y bioactividad de las fracciones obtenidas por RP-HPLC

El análisis cromatográfico reveló diferencias significativas en los perfiles peptídicos según los tratamientos enzimáticos aplicados a las muestras (Figura 5). En el caso de las muestras Pep y Pep+US, se observaron cinco picos alrededor de los minutos 3, 9, 13, 17 y 25, así como una distribución más amplia e intensa de péptidos entre los 30 y 42 minutos. Esto sugiere la presencia de una mezcla peptídica con diversas características, destacando una mayor proporción de péptidos menos polares. El tratamiento secuencial Pep+Alc mostró un perfil más distinto, con mayor intensidad de picos en tiempos de elución tempranos y menor a partir del minuto 30, indicando una reducción en la cantidad de péptidos hidrofóbicos (Figura 5A).

En la Figura 5B, se muestran los perfiles de los hidrolizados tratados con alcalasa, los cuales son similares en las tres muestras (Alc, Alc+US, Alc+Pep). Se observaron cuatro picos de alta intensidad alrededor de los minutos 3, 13, 17 y 25, de modo que estos tiempos de elución sugieren una alta concentración de péptidos con características moderadamente hidrofílicas. Sin embargo, Alc+US mostró una mayor absorbancia de los picos especialmente entre los 22 y 38 minutos, indicando una mayor concentración de péptidos hidrofóbicos en esta muestra. Esta distribución sugiere que los US podrían estar facilitando una ruptura más eficiente de los enlaces peptídicos, permitiendo la generación de una mayor cantidad de péptidos hidrofóbicos en comparación con los otros tratamientos.

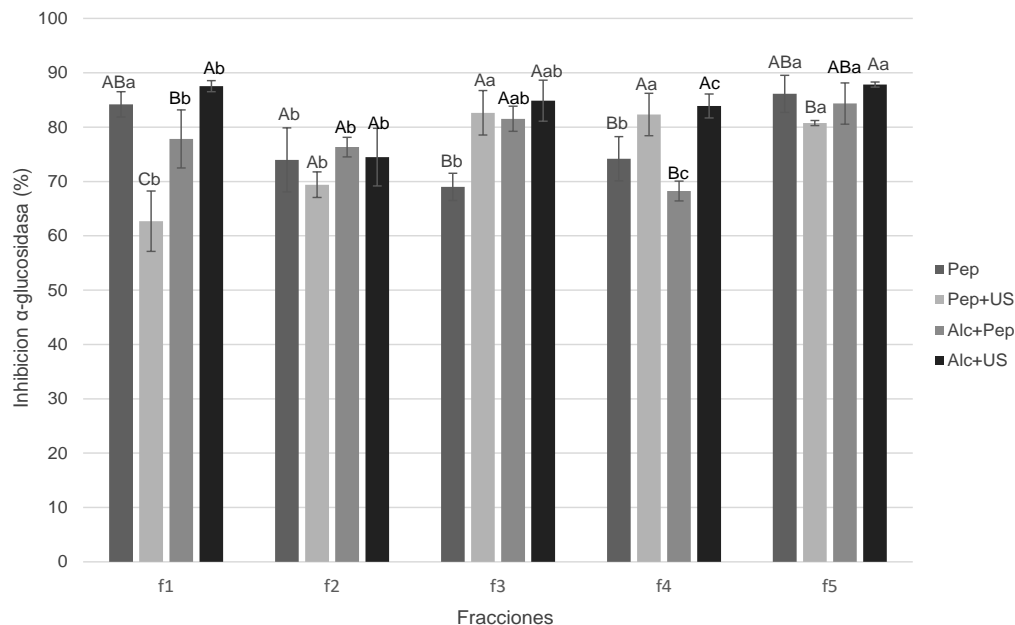
Tras obtener los perfiles peptídicos, aquellas muestras que presentaron potencial actividad antidiabética (Figura 4) fueron fraccionadas mediante RP-HPLC, y las fracciones fueron agrupadas para evaluar su actividad *in vitro*. A pesar de que las fracciones obtenidas fueron concentradas aproximadamente 30 veces, no mostraron inhibición de  $\alpha$ -amilasa, por lo que la separación de péptidos por polaridad podría afectar negativamente a la unión y efecto inhibitorio de los péptidos sobre esta enzima.



**FIGURA 5.** Perfiles peptídicos de los hidrolizados obtenidos por RP-HPLC.

Sin embargo, las fracciones sí presentaron una actividad significativa en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 6). La actividad varió entre las diferentes fracciones y tratamientos enzimáticos, aunque todas las fracciones mostraron valores superiores al 60 %, destacando especialmente las fracciones 1 y 5 (f1 y f5) de la muestra Alc+US que alcanzaron valores cercanos al 90 %. Las fracciones f1 y f5 de la muestra Pep también mostraron una elevada inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, a pesar de que la distribución de los péptidos en estas fracciones fue más heterogénea, con una mayor proporción de péptidos polares en f1 y apolares en f5. Las fracciones f3, f4 y f5 de la muestra Pep+US así como f3 de Alc+Pep y f5 de Alc+US, las cuales contendrían péptidos con características más apolares, mostraron la mayor inhibición dentro de cada muestra. Por otro lado, a pesar de que Alc mostró mayor intensidad de picos en los tiempos de elución correspondientes a f2 en comparación con las otras muestras, los resultados de inhibición fueron

similares en todos los casos. Pep y Alc+Pep mostraron la menor actividad en f4, a pesar de que estas muestras presentaron un perfil de péptidos amplio en esta zona de elución. En f5, aunque los perfiles peptídicos en estos tiempos de elución fueron muy bajos, todas las muestras presentaron en actividad mayor al 80 %. Estos resultados sugieren la importancia de la hidrofobicidad de los péptidos para ejercer esta actividad, aunque también influirían otras características que deberían ser estudiadas.



**FIGURA 6.** Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas entre la misma fracción entre distintas muestras, mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre fracciones dentro de una misma muestra ( $P < 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSIONES

El estudio mostró que la enzima alcalasa es particularmente efectiva para la hidrólisis de proteínas de riñón bovino. La actividad antioxidante de los hidrolizados varió en función del ensayo utilizado, pero el uso de pepsina favoreció la generación de péptidos con potencial antidiabético, destacando la muestra que combinó el tratamiento de la enzima con ultrasonidos que presentó valores mayores al 70 % en inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. El análisis cromatográfico permitió conocer los perfiles peptídicos de los hidrolizados y las fracciones obtenidas solamente presentaron actividad inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa. Se necesitan estudios adicionales mediante espectrometría de masas para elucidar las secuencias de los péptidos contenidos en cada hidrolizado o fracción, así como el uso de herramientas

bioinformáticas para conocer sus características y así relacionarlas con los resultados de bioactividad obtenidos. A pesar de ello, este estudio muestra que los hidrolizados de riñón bovino podrían ser valiosos como ingredientes en el desarrollo de alimentos funcionales dirigidos a mejorar la salud metabólica y antioxidante. Además, este enfoque permite dar valor añadido a este subproducto, promoviendo la sostenibilidad y economía circular en la gestión de residuos de la industria cárnica.

## 5. REFERENCIAS

- Abadía-García, L; Castaño-Tostado, E; Ozimek, L; Romero-Gómez, S; Ozuna, C; Amaya-Llano, S. L. 2016. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84–90. DOI: 10.1016/J.IFSET.2016.08.010
- Arise, R. O; Idi, J. J; Mic-Braimoh, I. M; Korode, E., Ahmed, R. N; Osemwegie, O. 2019. *In vitro* Angiotensin-1-converting enzyme,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Luffa cylindrical (L.) M. Roem seed protein hydrolysate. *Heliyon*, 5(5), e01634. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01634
- Carrera-Alvarado, G; Toldrá, F; Mora, L. 2023. Potential of Dry-Cured Ham Bones as a Sustainable Source to Obtain Antioxidant and DPP-IV Inhibitory Extracts. *Antioxidants*, 12(6), 1151. DOI: 10.3390/antiox12061151
- Connolly, A; Piggott, C. O; FitzGerald, R. J. 2014. In vitro  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 56, 100–107. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.12.021
- Huang, D.; Boxin, O. U; Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6), 1841–1856. DOI: 10.1021/jf030723c
- Ibrahim, M. A; Bester, M. J., Neitz, A. W. H; Gaspar, A. R. M. 2018. Structural properties of bioactive peptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology and Drug Design*, 91(2), 370–379. DOI: 10.1111/cbdd.13105
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
- Lafarga, T; Álvarez, C; Hayes, M. 2017. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12418. DOI: 10.1111/jfbc.12418
- Liao, W; Gu, L; Zheng, Y; Zhu, Z; Zhao, M., Liang, M; Ren, J. 2016. Analysis of the quantitative structure-activity relationship of glutathione-derived peptides based on different free radical scavenging systems. *MedChemComm*, 7(11), 2083–2093. DOI:10.1039/c6md00006a
- Ma, S; Wang, C; Guo, M. 2018. Changes in structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 43, 227–236. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2018.01.017
- Mohd Rodhi, A; Yap, P. G; Olalere, O. A; Gan, C. Y. 2023. Exploring  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Peptides: Structure-Activity Relationship Analysis and Perspectives for Designing Potential Anti-Diabetic Agents. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 18(4), e139988. DOI: 10.5812/jjnpp-139988

- Mullen, A. M; Álvarez, C. 2015. Offal: Types and Composition. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 152–157). DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00501-8
- Ozturk-Kerimoglu, B; Heres, A., Mora, L.; Toldrá, F. 2023. Antioxidant peptides generated from chicken feet protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(14), 7207–7217. DOI: 10.1002/jsfa.12802
- Ozuna, C; Paniagua-Martínez, I; Castaño-Tostado, E; Ozimek, L; Amaya-Llano, S. L. 2015. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, 685–696. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.10.015
- Prior, R. L; Wu, X; Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10), 4290–4302. DOI: 10.1021/jf0502698
- Rivero-Pino, F; Espejo-Carpio, F. J; Guadix, E. M. 2020. Antidiabetic food-derived peptides for functional feeding: production, functionality and in vivo evidences. *Foods*, 9(8), 983. DOI: 10.3390/foods9080983
- Su, J; Cavaco-Paulo, A. 2021. Effect of ultrasound on protein functionality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73 105653. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105653
- Subhedar, P. B; Gogate, P. R. 2013. Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(34), 11816–11828. DOI: 10.1021/ie401286z
- Tacias-Pascacio, V. G; Morellon-Sterling, R; Siar, E. H; Tavano, O; Berenguer-Murcia, Á; Fernandez-Lafuente, R. 2020. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.060
- Toldrá, F; Mora, L; Reig, M. 2016. New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54–59. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.04.021
- Toldrá, F; Reig, M., Gallego, M; Mora, L. 2023. Bioactive Peptides in Meat and Meat Products. *Meat and Muscle Biology*, 7(3), 16243. DOI:10.22175/mmb.16243
- Toldrá, F; Reig, M; Mora, L. 2021. Management of meat by- and co-products for an improved meat processing sustainability. *Meat Science*, 181, 108608. DOI: 10.1016/J.MEATSCI.2021.108608
- Vilcacundo, R; Martínez-Villaluenga, C; Hernández-Ledesma, B. 2017. Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. DOI:10.1016/J.JFF.2017.06.024
- Zhou, H; Safdar, B; Li, H; Yang, L; Ying, Z; Liu, X. 2023. Identification of a novel  $\alpha$ -amylase inhibitory activity peptide from quinoa protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 403, 134434. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2022.134434
- Zhu, L; Chen, J; Tang, X; Xiong, Y. L. 2008. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714–2721. DOI: 10.1021/jf703697e
- Zou, T. Bin, He, T. P; Li, H. Bin, Tang, H. W; Xia, E. Q. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72. DOI: 10.3390/molecules21010072

## ANEXO

### GRADO DE RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				X
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>		X		
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>	X			
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				X
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				X
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				X
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				X
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>			X	
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>	X			
ODS10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>				X
ODS11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				X
ODS12. <b>Producción y consumo responsables.</b>	X			
ODS13. <b>Acción por el clima.</b>		X		
ODS14. <b>Vida submarina.</b>				X
ODS15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>				X
ODS16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				X
ODS17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				X

Este trabajo contribuye de manera significativa a varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en particular al 3, 9 y 12. En cuanto al ODS 3 (Salud y Bienestar), el estudio promueve la mejora de la salud pública al identificar nuevas fuentes de péptidos bioactivos con potencial antioxidante y antidiabético, lo que podría llevar al desarrollo de alimentos funcionales o complementos nutricionales que contribuyan a la prevención y manejo de enfermedades crónicas como la diabetes y el estrés oxidativo. El ODS 9 (Industria, Innovación e Infraestructuras) se ve beneficiado por la aplicación de tecnologías innovadoras, como la hidrólisis enzimática y los ultrasonidos, en la valorización de subproductos animales, fomentando la investigación y el desarrollo de procesos más eficientes en la industria alimentaria. Estas tecnologías permiten no solo optimizar el aprovechamiento de recursos, sino también impulsar la creación de productos de alto valor añadido a partir de materiales subutilizados. El estudio respalda el ODS 12 (Producción y Consumo Responsables) ya que propone un enfoque sostenible para la revalorización de subproductos cárnicos, como el riñón, que generalmente tienen un uso limitado o se consideran residuos. Este tipo de investigaciones promueven un enfoque de economía circular, minimizando el desperdicio y aprovechando al máximo los recursos disponibles, para contribuir a la sostenibilidad del sistema alimentario global.