



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**



---

“Modificación de la Actividad enzimática de Lisozima de Clara de Huevo de Gallina, por hidrólisis gástrica y tratamiento térmico (microondas)”.

---

Trabajo de titulación, modalidad: proyecto de investigación, presentado como requisito previo a la obtención del título de ingeniera en alimentos

Este trabajo es parte del proyecto **“Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de amaranto y quinua para la elaboración de un alimento funcional”**. aprobado por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato. Con Resolución N° 1373-CUP-2014. Coordinado por el Dr. Ismael Carrillo Ph.D.

**Autor(a):** Tubón Ocaña Jessica Magaly

**Tutor:** Carrillo Terán, Wilman Ismael Ph.D.

Ambato–Ecuador

2016

## APROBACIÓN DEL TUTOR

**Carrillo Terán, Wilman Ismael PhD**

### **CERTIFICA:**

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación Modalidad Proyecto de Investigación, que el presente trabajo ha sido minuciosamente revisado. El mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 23 de junio del 2016



.....  
Carrillo Terán, Wilman Ismael PhD

C.I. 17570800-4

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jessica Magaly Tubón Ocaña, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la Obtención del Título de Ingeniería en Alimentos, son de mi exclusiva responsabilidad como autora los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, excepto las citas.



Srta. Jessica Magaly Tubón Ocaña

CI: 180443229-0

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



---

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



---

Mg. Dánae Fernández Rivero  
C.I. 175718120-9  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

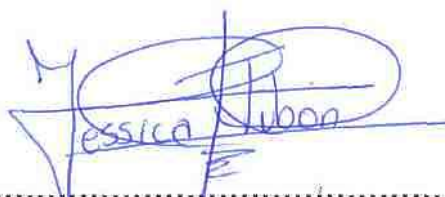
Mg. Lcdo. Paulo Santiago Baquero Icaza  
C.I.180323354-1  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ambato, 24 de Agosto del 2016

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y proceso de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.



.....

**Srta. Jessica Magaly Tubón Ocaña**  
**CI: 180443229-0**  
**AUTORA**

## DEDICATORIA

*“Tu mayor competidor es lo que quieres llegar a ser.”*

**Jim Taylor**

*A **Dios** por haberme llenado de bendiciones a lo largo de mi carrera profesional, por haber sido quien me extendió su mano cuando estaba a punto de caer, por poner en mi camino a aquellas personas que han sido mi apoyo y compañía a lo largo de mi carrera.*

**A mi madre** Lucila Ocaña

*Por su apoyo incondicional, valores, educación, y sobre todas las cosas por su amor infinito.*

**A mi padre** Walter Tubón

*Gracias por ser la persona que me inspiro a luchar por mis sueños, a pesar de las adversidades de la vida.*

**A mi hermana** Paola Tubón

*Por haber luchado juntas para no defraudar a nuestros padres.*

**A mi Amiga-hermana** María Fernanda Quinteros

*Mi amiga-hermana por tus consejos, tu ayuda desinteresada, por brindarme tu mano cuando más lo necesite, gracias no solo por ello, sino por los buenos momentos que vivimos.*

*Jessica Tubón*

## AGRADECIMIENTOS

*“Todo lo que ocurre en la vida, tiene una razón de ser”*

**Anónimo**

A la **UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO**, por ende a la **FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS**, por brindarme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi **TUTOR** de tesis PhD Ismael Carrillo por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado en mí que culmine mis estudios con éxito. A la Ingeniera Cecilia Carpio por su paciencia y apoyo en mi trabajo, Ing. Mónica Silva, Ing. Mario Álvarez, a mis calificadores Ing. Dánae Fernández y Ing. Paulo Baquero.

A mis abuelitas Josefina Punguil, Maruja Chaguamate y a mi tía Elizabeth Chaguamate.

A mi familia de corazón Sandra, William, Danny, Criss, Rosa, Dunker, Ariel, Ismael, Scarlet, gracias por abrirme las puertas de su hogar.

A mis amigas Marjorie Cárdenas, Fernanda Sandoval, Tatiana Poveda, Gabriela Cando, Gissela Reyes, Mary Robayo han sido mi pilar fundamental en este logro las quiero mucho.

A mis amigos Jimmy Martínez, Bolívar Núñez, Diego Chaglla, Marcelo Robayo mis sinceros agradecimientos por su apoyo moral.

*“Tengo un sin número de personas que me apoyaron a lo largo de mi carrera profesional a todos ustedes mi agradecimiento más sincero y que Dios los bendiga siempre.”*

*Jessica Tubón*

## INDICE

<b>1. CAPITULO</b> .....	4
<b>EL PROBLEMA</b> .....	4
1.1. Tema.....	4
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos .....	5
1.3.1. General .....	5
1.3.2. Específicos .....	5
<b>2. CAPÍTULO</b> .....	7
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	7
2.1. Antecedentes investigativos.....	7
2.1.1. Huevo de gallina.....	7
2.1.2. Proteínas .....	8
2.1.3. Actividad enzimática .....	8
2.1.4. Purificación de la lisozima .....	9
2.1.5. Métodos para cuantificar la proteína .....	9
2.1.6. Métodos de determinación de aminoácidos .....	10
2.1.6.1. Digestibilidad gastrointestinal.....	11
2.1.7. Electroforesis.....	12
2.2. Hipótesis.....	12
1.1. Señalamiento de variables de la hipótesis.....	13
<b>3. CAPÍTULO</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Materiales .....	14
3.2. Métodos .....	15
<b>4. CAPÍTULO</b> .....	25
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25
4.1. Análisis y discusión de los resultados .....	25
4.1.1. Purificación de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina. ....	25
4.1.2. Cuantificación de la proteína purificada de lisozima de clara de huevo de gallina por el método BCA y Dumas. ....	25



4.1.3. Purificación de lisozima de clara de huevo mediante cromatografía de intercambio iónico (FPLC) .....	26
4.1.4. Análisis de la lisozima de clara de huevo de gallina mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) llevados a digestión gástrica y duodenal <i>in vitro</i> .....	28
4.1.4.1. Simulación de la digestión gástrica <i>in vitro</i> .....	28
4.1.4.2. Digestión duodenal <i>in vitro</i> .....	31
4.1.5. Evaluación de las actividades biológicas por tratamiento térmico.....	32
4.1.5.1. Evaluación de la actividad muramidasa.....	32
4.1.5.2. Citotoxicidad de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina en el modelo pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	38
4.1.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	40
4.1.5.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante modelo pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	40
4.1.5.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	41
4.1.6. Análisis RP-HPLC.....	42
4.2. Verificación de la hipótesis.....	47
<b>5. CAPÍTULO .....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>48</b>

## Índice de tablas y figuras

**Tabla 1.** Materiales de laboratorio y acuario, equipos, reactivos utilizados durante la investigación.

**Tabla 2.** Resultados de la concentración de proteína (mg/g) de lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial.

**Tabla 3** Prueba de comparación múltiple test tukey en la concentración de proteína (mg/g) de lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial por el método BCA.

**Tabla 4** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de dos minutos.

**Tabla 5** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de seis minutos.

**Tabla 6** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a dos minutos.

**Tabla 7** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a seis minutos.

**Tabla 8** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de dos minutos.

**Tabla 9** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de seis minutos.

**Tabla 10** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a dos minutos

**Tabla 11** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a seis minutos.

**Tabla 12.** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial con respecto a su porcentaje de su actividad antioxidante.

**Figura 1.** Estructuras repetitivas del peptidoglicano de la pared celular de bacterias se muestra el sitio de corte de la lisozima.

**Figura 2.** Descripción grafica de la corrida de geles con la solución de buffer, las muestras gel arriba con tris HCL a pH 6,8, gel abajo con Tris HCL pH 8,8 y la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular

**Figura 3.** Separación de lisozima de clara de huevo por cromatografía de intercambio iónico.

**Figura 4.** Análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima sin pepsina, pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 1,2 (60 minutos), pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 1,2 (90 minutos), pocillo 5: lisozima con pepsina a pH 1,2 (120 minutos), pocillo 6: lisozima con pepsina a pH 2,0 (60 minutos), pocillo 7: lisozima con pepsina a pH 2,0 (90 minutos), pocillo 8: lisozima con pepsina a pH 2,0 (120 minutos), pocillo 9: lisozima con pepsina a pH 3,2 (60 minutos), pocillo 10: lisozima con pepsina a pH 3,2 (90 minutos), pocillo 11: lisozima con pepsina a pH 3,2 (120 minutos) y pocillo 12: pepsina en blanco.

**Figura 5.** Análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo comercial hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima con pepsina a pH 1,2; pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 2,0; pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2; pocillo 5: lisozima comercial sin pepsina

**Figura 6.** Análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo aislada hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima con pepsina a pH 1,2; pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 2,0; pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2; pocillo 5: lisozima aislada sin pepsina

**Figura 7.** Análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo de gallina comercial. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima sin

pepsina, pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 3,2, pocillo 4: digestión duodenal.

**Figura 8.** Análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo de gallina aislada, pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima de clara de huevo de gallina aislada sin pepsina, pocillo 3: lisozima de clara de huevo de gallina con pepsina a pH 3,2, pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2 (120 minutos).

**Figura 9.** La actividad enzimática residual de la lisozima de clara de huevo, hidrolizados de lisozima con pepsina a pHs 1,2, 2,0 y 3,2 durante 60 minutos.

**Figura 10.** Hidrolizados de lisozima con pepsina a pHs 1,2 ; 2,0 y 3,2 durante 90 minutos.

**Figura 11.** Hidrolizados de lisozima con pepsina a pH 1,2; 2,0 y 3,2 durante 120 minutos.

**Figura 12.** Actividad muramidasa residual de lisozima comercial (CLZ), lisozima de clara de huevo aislada (ILZ), hidrolizado de lisozima comercial (HCLZ) e hidrolizado de lisozima de clara de huevo aislada (HILZ). La disminución de la turbidez de una suspensión de células de *Micrococcus lysodeikticus* se determinó a 450 nm en tampón fosfato a pH 6,24 y 25 °C.

**Figura 13.** Actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo comercial donde T4 está representado a 60 segundos con 100 % de potencia, T2 30 segundos a 100 % de potencia, T3 60 segundos a 50 % de potencia, T1 30 segundo a 50 % de potencia en el microondas respectivamente a los dos minutos.

**Figura 14.** Actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo comercial sometida a hidrolisis gástrica a pH 1,2; pH 2,0; pH 3, a los dos minutos.

**Figura 15.** actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo purificada donde T4 está representado a 60 segundos con 100 % de potencia, T2 30 segundos a 100 % de potencia, T3 60 segundos a 50 % de potencia, T1 30 segundo a 50 % de potencia en el microondas respectivamente a los dos minutos

**Figura 16.** Actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrólisis gástrica a pH 1,2; pH 2,0; pH 3, a los dos minutos.

**Figura 17.** Tasa de supervivencia de los embriones de pez cebra expuestos con varias concentraciones de lisozimas durante 48 horas.

**Figura 18.** Fotografía de huevo de pez cebra después de 48 horas de incubación con lisozima de clara de huevo.

**Figura 19.** los resultados Tbar de lisozima. los datos se expresan como la inhibición de TBARS % en comparación con un control negativo (las barras de error expresan como  $\pm$  SD). n=30 larvas de pez cebra lisozima comercial (CLZ), lisozima aislada (OSR), hidrolizado de lisozima comercial (HCLZ) e hidrolizado de lisozima aislada (HILZ).

**Figura 20.** Morfologías de larvas de pez cebra después de la incubación con lisozima.

**Figura 21.** los resultados Tbar de lisozima de clara de huevo de gallina representado como % de actividad antioxidante con un control positivo (BHT), lisozima de clara de huevo comercial, lisozima de clara de huevo purificada.

**Figura 22.** Análisis en RP-HPLC de hidrolizados de lisozima de clara de huevo durante 60 minutos.

**Figura 23** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina comercial sin hidrolizar.

**Figura 24.** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada sin hidrolizar.

**Figura 25.** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada hidrolizado a pH 1,2 con pepsina

**Figura 26.** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada hidrolizado a pH 2,0 con pepsina

**Figura 27.** Análisis en U-HPLC de hidrolizado de lisozima de clara de huevo de gallina comercial durante 12 minutos a pH 2,0.

**Figura 28.** Análisis en U-HPLC de hidrolizado de lisozima de clara de huevo de gallina comercial durante 12 minutos a pH 3,2.

**Figura 29.** espectrofotometro DR500

**Figura 30.** Digestión duodenal por dos horas.

**Figura 31.** Digestión gástrica 37 °C por una hora

**Figura 32** sistemas de electroforesis.

**Figura 33** corrida de los geles de poliacrilamida

**Figura 34** gel de lisozima aislada antes del teñido con azul de coomassie

**Figura 35** gel de lisozima comercial antes del teñido con azul de coomassie

**Figura 36** muestras para actividad antioxidante.

**Figura 37** solución de fosfatidilcolina oxidada y no oxidada para la actividad antioxidante.

**Figura 38** muestras sometidas a 8 horas para la actividad antioxidante

**Figura 39** preparación de la muestra para ser medida la actividad antioxidante en el espectrofotómetro de los laboratorios de canje de deuda.

**Figura 40** preparación de las muestras para la actividad antioxidante en el espectrofotómetro.

**Figura 41** lectura de las absorbancias de las muestras

**Figura 42** equipo UHPLC

**Figura 43** sistema del UHPLC

**Figura 44** partes del UHPLC

**Figura 45** funcionamiento del UHPLC

**Figura 46** jeringa para la succión de las muestras para el UHPLC.

**Figura 47** sistema de filtración de agua Mili Q

**Figura 48** membranas de filtración de agua

**Figura 49** muestra de lisozima comercial para ser calentada en el microondas

**Figura 50** muestra de lisozima aislada para ser calentada en el microondas.

**Figura 51** pesado de la lisozima purificada.

## Resumen

La lisozima de clara de huevo de gallina es una proteína que puede representar cerca del 3,5 % de las mismas. También es fuente de aminoácidos esenciales para la alimentación humana, lo que ha motivado a realizar un estudio exhaustivo, principalmente de su proteína. En este estudio se trabajó con lisozima de clara de huevo comercial y la purificada en el laboratorio de alimentos funcionales "BIPROPEPTI". Estas dos muestras fueron modificadas en su actividad enzimática por hidrólisis gástrica y tratamiento térmico con microondas.

Se logró purificar la lisozima de clara de huevo de gallina mediante el uso de cromatografía rápida de proteínas (FPLC) y precipitación en NaCl 1 M presentaron actividad enzimática. Además, la hidrólisis gástrica de la lisozima de clara de huevo de gallina demostró que a pH 1,2 la hidrólisis fue total. También, los hidrolizados gástricos de lisozima de clara de huevo de gallina comercial a pH 1,2; 2,0 y 3,2 presentaron actividad enzimática de 23, 47 y 42 % respectivamente. De igual manera, los hidrolizados de lisozima de clara de huevo de gallina purificada presentaron valores de actividad enzimática como 20, 35 y 48 % a pHs 1,2; 2,0 y 3,2 respectivamente. La lisozima de clara de huevo de gallina comercial y purificada sometida a calentamiento (microondas) presentaron actividades enzimáticas de 99, 92, 85 y 73 % en la lisozima comercial respectivamente. También, la lisozima purificada presentó actividades enzimáticas de 99, 97, 96 y 95 %. El hidrolizado de ambas lisozimas comercial y purificada fueron capaces de inhibir la peroxidación lipídica en larvas de pez cebrá.

**Palabras claves:** lisozima, cromatografía de intercambio catiónico, hidrólisis enzimática, actividad muramidasa.

## Abstract

The lysozyme is a chicken egg protein may represent about 3.5% of them. It is also a source of essential amino acids for human consumption, which has led to a thorough study, mainly from its protein. In this study we worked with lysozyme and purified commercial egg in the laboratory of functional foods "BIPROPEPTI". These two samples were modified in their enzymatic activity gastric hydrolysis and heat treatment with microwaves.

It was possible to purify the lysozyme from chicken egg by using protein flash chromatography (FPLC) and 1 M NaCl precipitation showed enzymatic activity. In addition, gastric hydrolysis of lysozyme from chicken egg at pH 1.2 showed that hydrolysis was complete. Also, gastric hydrolysates of egg white lysozyme commercial hen at pH 1.2; 2.0 and 3.2 showed enzymatic activity of 23, 47 and 42% respectively. Similarly, hydrolysates of egg white lysozyme purified hen enzyme activity values presented as 20, 35 and 48% at pH 1.2; 2.0 and 3.2 respectively. The lysozyme of egg white and purified commercial hen subjected to heating (microwave) had enzyme activities of 99, 92, 85 and 73% in commercial lysozyme respectively. Also, the purified lysozyme introduced enzymatic activities of 99, 97, 96 and 95%. The hydrolyzate of both commercial and purified lysozyme were able to inhibit lipid peroxidation in zebrafish larvae.

**Keywords:** Lysozyme, cation exchange chromatography, enzymatic hydrolysis, muramidase activity.



## INTRODUCCIÓN

La lisozima, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidoglucano hidrolasa, E.C.3.2.1.17) fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming. Es la primera proteína de la que se dispuso su secuencia por cristalografía de rayos-X, además la primera enzima de la que se determinó su mecanismo enzimático gracias a los trabajos de David Phillis desarrollados en 1966 **(Jollés et al., 1984)**.

La clara de huevo se sabe que presenta un alto contenido de lisozima, normalmente la lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,5 % de las proteínas de la clara de huevo **(You et al., 2010; Memarpoor Yazdi et al., 2012; Mine et al., 2004; 2008)**. La lisozima es una proteína básica que contiene 129 residuos de aminoácidos y su peso molecular es de 14.3 kDa. Esta enzima actúa por lisis de las paredes celulares de algunas bacterias Gram-positivas tales como bacterias de ácido láctico (LAB) y *Clostridium sp* mediante el fraccionamiento del enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglucano de la pared celular bacteriana **(Callewaert et al., 2010; Carrillo et al., 2014; Cegieska-Radziejewska et al., 2009; 2010)**.

Lisozima ha sido asociada con muchas actividades biológicas como antibacteriana, antiviral, antioxidante, antitumoral, inmunomoduladora, inmunoestimulante entre otras actividades **(Jiménez et al., 2012; Lunow et al., 2013, Carrillo et al., 2014, Abdou et al., 2005; Ibrahim et al., 1996b; 2001a, b; 2005a; Lesnierowski et al., 2004; 2013)**. Los métodos de separación clásicos de proteínas se basan en la salinización de la solución o precipitación con alcohol. Se han extendido el uso por la cromatografía de intercambio iónico y de separación de membrana en los últimos años. Actualmente, los investigadores están buscando métodos de separación, que sean baratos, fáciles, y no tóxicos. El mantenimiento de la actividad

biológica es más alto de las proteínas aisladas **(Awade et al., 1996; Chiu et al., 2007; Lesniakowski et al., 2007, 2009)**.

La actividad enzimática también es conocida como actividad muramidasa o actividad lítica **(Mine et al., 2008; Cegielska-Radziejewska et al., 2009)**. Los ocho alimentos tradicionalmente consideradas responsables de más del 90 % de la alergia a los alimentos son los productos lácteos, huevos, pescado, mariscos, maní, nueces, trigo y soja **(Achouri et al., 2013)**. Existen alergias a los alimentos, la alergia al huevo es, junto con el maní y la leche, la más común en niños y bebés, con una prevalencia que varía entre el 7,9 y el 10 % **(Osborne et al., 2011; Sicherer et al., 2011)**. En general se cree que una proteína, que es resistente a la digestión proteolítica en el tracto digestivo, retiene una integridad estructural suficiente para tener una mayor probabilidad de estimular las reacciones inmunes en el organismo. Pequeñas cantidades de proteínas intactas o proteínas parcialmente digeridas se absorben en el intestino y entran en el sistema circulatorio. El Fluido Gástrico Simulado (SGF), se compone de cloruro de sodio y ha sido recomendado por la farmacopea europea y americana, el mismo que se utiliza para determinar la digestibilidad y alergenicidad de una proteína **(Orruño et al., 2011)**.

El proceso de la digestión juega un papel importante en la sensibilización alérgica. Saber que le sucede a los alérgenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (fragmentación, absorción, biodisponibilidad y conjugación con otras proteínas) es importante para el conocimiento del mecanismo que subyace en las alergias alimentarias. Un gran número de alérgenos alimentarios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre estas proteínas hay ciertas características comunes, se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesado, sobre todo al tratamiento térmico **(Taylor et al., 1996)**.

Se sabe que los tratamientos térmicos modifican la estructura de las proteínas. La desnaturalización produce cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de una molécula proteica, en ocasiones la desnaturalización puede ser irreversible dependiendo de la intensidad y duración del tratamiento **(Garrido, 2006)**.

## **1. CAPITULO**

### **EL PROBLEMA**

#### **1.1. Tema**

“Modificación de la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo de gallina, por hidrólisis gástrica y tratamiento térmico (microondas)”

#### **1.2. Justificación**

La lisozima posee actividades biológicas como actividad antioxidante (Liu et al., 2006), actividad antiheparínica (Mega et al., 1994), actividad antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim et al., 2001), actividad antiinflamatoria (Sava, 1996), actividad frente al virus del VIH tipo 1 en ensayos in vitro (Lee-Huang et al., 1999), proponiéndose como mecanismo de acción que la actividad antiviral puede estar asociada con su carga positiva y las interacciones con la superficie de la membrana del virus cargadas negativamente (Losso et al., 2000).

Organismos internacionales como la FAO/WHO determinan que la lisozima de clara de huevo de gallina es una proteína no tóxica y por ello es utilizada para fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos, se estima que más de 100 toneladas de lisozima son usados anualmente para estos propósitos (Mine et al., 2004). La lisozima de huevo de gallina está catalogada como aditivo de uso alimentario con el código (E-1105). Vegetales frescos, pescado, carne, frutas, langostinos y otros alimentos han sido preservados por contacto de la superficie del alimento con la lisozima. Entre sus usos encontramos la protección en los quesos frente a bacterias dañinas como el

*Clostridium tyrobutyricum* que provoca la hinchazón de los quesos (Mine et al., 2004).

Existen muchos trabajos científicos que buscan modificar la actividad enzimática de la lisozima usando diferentes tratamientos tecnológicos como son tratamiento térmico, enzimático, químico y modificación genética. Algunos con éxito y otros no lo han logrado. (Ibrahim et al., 2001 y Mine et al., 2004). La lisozima de clara de huevo tiene resistencia a la hidrólisis enzimática, ya que es un alérgeno alimentario (Mine et al., 2008), de esta manera, se contribuirá a disminuir su alergenicidad y posibilitar su uso en la industria alimentaria. Además, en este trabajo se busca describir su digestibilidad simulando las condiciones fisiológico-humanas. Por esta razón en este estudio se pretende modificar la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina mediante hidrólisis gástrica y tratamiento térmico con microondas, también se evaluará la actividad antioxidante para saber si se modifica o se potencia dicha actividad.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

- Modificar la actividad enzimática por hidrólisis gástrica y tratamiento térmico con microondas.

#### **1.3.2. Específicos**

- Determinar la actividad enzimática residual de la lisozima de clara de huevo modificada térmicamente y con hidrólisis.
- Caracterizar la lisozima de clara de huevo tratada térmicamente y con hidrólisis mediante electroforesis SDS-PAGE.

- Cuantificar la lisozima de clara de huevo modificada térmicamente y con hidrólisis.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* (método ORAC) e *in vivo* modelo pez cebra (*Danio rerio*) de la proteína de la lisozima de clara de huevo tratada térmicamente y con hidrólisis.

## 2. CAPÍTULO

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. Huevo de gallina

El huevo, como alimento, puede ser considerado como una fuente de proteína adecuada para la alimentación humana. La albúmina (clara de huevo), se trata de una barrera muy importante contra la invasión microbiana por su acción bacteriostática y bactericida para ciertas especies de bacterias. Contiene sustancias antimicrobianas que restringen o inhiben totalmente el crecimiento de flora invasora. Su acción protectora se debe a su elevado pH inicial, y a la presencia de sustancias inhibidoras:

- Lisozima: enzima que lisa las paredes de las bacterias Gram positivas.
- Avidina: sustancia que, al combinarse con la biotina, bloquea su acción, que es indispensable para el crecimiento de muchos gérmenes.
- Conalbúmina: sustancia que bloquea algunos metales (hierro, cobre, y zinc) indispensables para el crecimiento de muchos gérmenes. Actúa frente a grampositivos y gramnegativos.
- Riboflavina: vitamina del complejo B que limita el crecimiento de algunos gérmenes.
- Proteína B: sustancia que inhibe la proteasa fúngica, limitando el crecimiento de hongos (**Anderson et al., 2000**).

### 2.1.2. Proteínas

Existen proteínas que presentan una fácil digestión, no hacen daño a la salud, y son nutricionales. Además, se encuentran en mayor proporción y disponibilidad en los alimentos **(Badui, 2006)**.

La solubilidad y estabilidad de las proteínas dependen del pH del medio, así como también del punto isoeléctrico (pI), el mismo que se ve influenciado por su estructura. El punto isoeléctrico a distintos pHs tiene un aumento significativo en la solubilidad de las proteínas, fuerza iónica, tipo de solvente y la temperatura **(Peña, 2004)**.

La lisozima de huevo de gallina ha sido la más estudiada, por encontrarse en alta concentración (1-3 g/l de clara de huevo), su fácil manejo y la posibilidad de purificación. La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,5 % de las proteínas de la clara de huevo **(You et al., 2010)**. La lisozima de clara de huevo tiene un 60% de homología con la lisozima de leche humana y comparten la resistencia a las enzimas proteolíticas **(Carrillo et al., 2014)**.

### 2.1.3. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la lisozima destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG) **[Figura 1]**, debilitando así la pared celular **(Carrillo et al., 2014)**



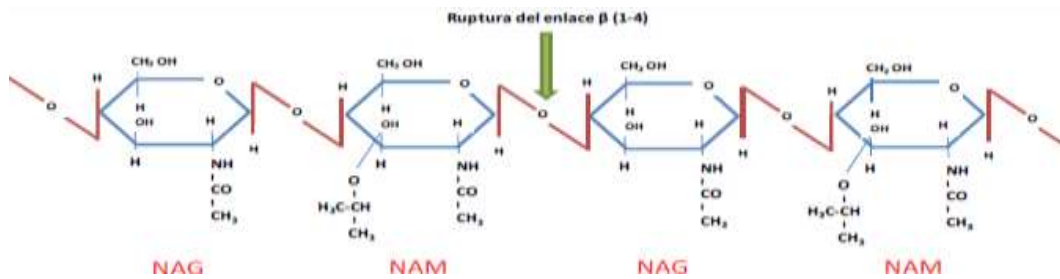


Figura 1. Estructuras repetitivas del peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Se muestra el sitio de corte de la lisozima.

#### 2.1.4. Purificación de la lisozima

Los métodos de separación clásicos de proteínas se basan en la salinización de la solución o precipitación con alcohol. Se han extendido el uso por la cromatografía de intercambio iónico y de separación por membrana en los últimos años (**Awade et al., 1996; Chiu et al., 2007; Lesniakowski et al., 2007; 2009**). En la actualidad también se han utilizado cromatografía de intercambio catiónico o ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico con columnas y membranas microporosas (**Chiu et al., 2007; Jiang et al., 2001**).

#### 2.1.5. Métodos para cuantificar la proteína

Los métodos para la cuantificación de proteínas, se fundamentan en la propiedad intrínseca de las mismas por la absorción de luz (UV), en la formación de procedentes químicos y poseen la posibilidad de unir diferentes colorantes (**Reyes et al., 2001**).

El método BCA (ácido bicinonónico) se encuentra fundamentado en la disminución de iones cúpricos donde los iones cuprosos están en medios alcalinos. Dichos iones cuprosos actúan con el ácido bicinonónico (BCA) dando como resultado un color púrpura, el mismo que es analizado

espectrofotométricamente, luego se relaciona mediante el contenido de proteínas **(Nielsen, 2010)**.

El método dumas se caracteriza por pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. El nitrógeno puede ser medido con manómetro después de absorber el dióxido de carbono en una solución alcalina o por conductividad térmica en métodos automatizados **(King 1978)**.

### **2.1.6. Métodos de determinación de aminoácidos**

Los aminoácidos constituyen la estructura primaria de la proteína y confieren el valor nutricional a los alimentos. Por lo tanto, para el análisis de los aminoácidos es necesario romper los enlaces peptídicos de las proteínas mediante la hidrólisis que puede ser ácida, alcalina o enzimática. La hidrólisis ácida se realiza con ácido clorhídrico de concentración 6N. El reactivo debe ser puro y no debe dejar residuos por lo que se recomienda una hidrólisis en fase gaseosa. Para que la hidrólisis de las proteínas sea completa es necesario tener en cuenta factores como ácido/proteínas, la temperatura y el tiempo de hidrólisis; evitar la presencia de oxígeno en el medio aplicando vacío y nitrógeno para minimizar la oxidación de los aminoácidos **(Pomeranz C et al., 1971)**

La hidrólisis ácida afecta la estructura de ciertos aminoácidos como

a) Destrucción parcial de treonina, serina, cistina, cisterna, metionina y tirosina. La destrucción de cistina, cisteína y metionina se evita oxidando primero la muestra con ácido perbromico y se determinan en su lugar el ácido cisteico y metionina sulfona. El triptófano se destruye totalmente con el ácido clorhídrico por lo que para su determinación es necesario realizar una hidrólisis alcalina.

- b) Conversión de: tirosina a un cloro derivado; asparagina a ácido aspártico y glutamina a ácido glutámico.
- c) Liberación lenta de isoleucina y valina.

Para compensar las pérdidas producidas en los aminoácidos y además para cuantificar los aminoácidos presentes se puede adicionar a la muestra antes de la hidrólisis, una cantidad conocida de un estándar interno que puede ser el ácido 2-aminobutírico. Los aminoácidos libres se derivan por métodos pre columna o post columna y se separan aplicando la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía líquida de alta resolución o la cromatografía gas-líquido **(Alaiz, M., et al. 1992)**

#### **2.1.6.1. Digestibilidad gastrointestinal**

La digestibilidad gastrointestinal se basa en 2 fases: la digestión mediante la hidrólisis de las moléculas complejas y la absorción de pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) dentro del intestino. Existen pruebas de digestión *in vitro* las que se han efectuado para analizar el contenido nutricional de dichas proteínas utilizando la pepsina **(Nielson, 1988; Budd et al., 1983)**. Mediante la digestibilidad se posibilita el aprovechamiento de un sin número de productos y subproductos para la industria alimentaria **(Pezzato et al., 2002)**.

El cuerpo humano ha desarrollado un sistema complejo mediante el cual desintegra y asimila los nutrientes de los alimentos. Existen estudios basados en animales, los mismos que son relacionados con el sistema humano. Si se realizaría estudios en humanos se necesitarían varios individuos voluntarios, además se requerirían normas éticas y el uso de técnicas adecuadas. Debido a ello se ha optado por modelos *in vitro* que se asemejan a modelos *in vivo* **(Carrillo, 2014)**.

Se han llevado a cabo estudios para identificar el potencial alergénico de las proteínas alimentarias utilizando también ensayos de digestibilidad *in vitro*

con pepsina en Fluidos Gástricos Simulados (SGF). Dichos estudios apoyan que la digestión puede ser utilizada como herramienta clave para predecir el potencial alergénico de las proteínas alimentarias (**Burks et al., 1997; Fu et al., 2002; Kenna et al., 2000**).

### **2.1.7. Electroforesis**

**Según Lameli, 1970** describe que la técnica de electroforesis fue usada por primera ocasión por Tiselius 1937, el mismo que creo el equipo de la electroforesis y determino que las proteínas se pueden separar mediante la acción de un campo eléctrico.

**Según Carrillo et al., 2013** describe el empleo de agentes reductores y el uso de SDS, mediante el cual se obtienen los pesos moleculares de las proteínas, a lo que nombro como la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Los pesos moleculares entre 10 -90 kDa necesitan un tamaño de poro de 10 -12% en un gel concentrador y separador (**Martínez et al., 2001**).

## **2.2. Hipótesis**

**Tema:** “Modificación de la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina, por hidrolisis gástrica y tratamiento térmico (microondas)”

**H<sub>01</sub>:** Se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante hidrólisis gástrica.

**H<sub>a1</sub>:** No se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante hidrolisis gástrica.

**H<sub>02</sub>:** Se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante tratamiento térmico.

**H<sub>a2</sub>:** No se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante tratamiento térmico.

### **1.1. Señalamiento de variables de la hipótesis**

Variable independiente (1): tratamiento térmico con microondas

Variable dependiente (1): actividad enzimática de lisozima de clara de huevo

Variable independiente (2): hidrólisis gástrica

Variable dependiente (2): actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.

### 3. CAPÍTULO

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1. Materiales

**Tabla 1.** Materiales de laboratorio y acuario, equipos, reactivos utilizados durante la investigación.

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS	ACUARIO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasos de precipitación</li> <li>• Balones de aforo</li> <li>• Probetas</li> <li>• Varillas de agitación</li> <li>• Magneto</li> <li>• Espátula</li> <li>• Kit Micropipetas</li> <li>• Tubos para centrifugar</li> <li>• Cajas Petri</li> <li>• Puntas para micropipetas</li> <li>• Tubos eppendorf</li> <li>• Envases herméticos</li> <li>• Tiras de pH</li> <li>• Goteros</li> <li>• Rotuladores</li> <li>• Guantes Látex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balanza</li> <li>• Agitador magnético</li> <li>• pHmetro</li> <li>• Centrifuga</li> <li>• Liofilizador</li> <li>• Espectrofotómetro</li> <li>• FPLC</li> <li>• HPLC</li> <li>• UHPLC</li> <li>• Agitador Vortex</li> <li>• Agitador para microtubos</li> <li>• Equipo de Electroforesis Bio-Rad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidróxido de sodio</li> <li>• Ácido clorhídrico</li> <li>• Cloruro de sodio</li> <li>• Bicarbonato de sodio</li> <li>• Enzimas</li> <li>• Sales biliares</li> <li>• β-mercaptoetanol</li> <li>• Tris-HCl</li> <li>• Acrilamida</li> <li>• SDS</li> <li>• Temed</li> <li>• PSA</li> <li>• Glicina</li> <li>• Glicerol</li> <li>• Azul de bromofenol</li> <li>• DMSO</li> <li>• Azul de Coomassie</li> <li>• Agua desionizada</li> <li>• Reactivo BCA</li> <li>• TBARS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peces de origen cebrá</li> <li>• Comida para peces (Artemia)</li> <li>• Peceras</li> <li>• Calentadores eléctricos</li> <li>• Termómetros</li> <li>• Filtros</li> <li>• Estantería</li> <li>• Tiras de nitritos</li> <li>• Solución azul de metileno</li> </ul>

Elaborado por: Tubón Jessica, 2016

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Purificación de lisozima de clara de huevo.**

La edad de los huevos de gallina deberá ser hasta seis horas.

Se utilizó 500 ml de clara de huevo tratadas con NaCl 1% y el pH ajustado a 3 para separar la mucina. La solución se centrifugó a 4 500 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1 M y fue analizado mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX) **(Carrillo et al., 2016)**

### **3.2.2. Cuantificación de la proteína de lisozima de clara de huevo**

#### **3.2.2.1. Método de BCA**

Se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de BCA (ácido bicinconínico), para ellos se utilizó un kit comercial de la marca Thermo. El propósito estuvo enfocado en la reducción de iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas de la proteína. Los iones cuprosos reaccionaron con el reactivo BCA proporcionando un color púrpura, que pudo cuantificarse espectrofotométricamente **(Nielsen, 2010)**

La lectura de los valores de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 562 nm. Para la interpretación de los resultados se trabajó con una recta patrón de BSA (Bovine Serum Albumin).

- Preparación de la muestra

En un tubo eppendorft se pesó 5mg de muestra, 1mL de agua y 75 µL de NaOH, luego se les introdujo un magneto pequeño y fue sometido a

agitación durante 15 minutos, posteriormente se sacaron los magnetos y se introdujo en una centrifuga por 15 minutos. Se tomaron 0,1 mL de la muestra preparada anteriormente con 1,9 mL de agua ultra purificada (dilución 1:20)

- Preparación de los estándares (BSA)

En un tubo eppendorf de 2 mL, se prepararon la solución madre con 0,2 mL de la ampolleta (Bovine Serum Albumin) y 1,4 mL de agua ultra purificada (UHT). Se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ L de la solución madre los que se diluyeron en 400, 300, 200 y 100  $\mu$ L de agua ultra purificada respectivamente. Todo lo anteriormente mencionado se realizó en base a peso en la balanza analítica, para disminuir el grado de error en sus cálculos.

- Preparación de la solución BCA (ácido bicinconínico)

Se lo realizo multiplicando el número de muestras finales por 1,4 mL de solución del reactivo (A y B), luego se aplicó una regla de tres para el reactivo blanco y para el reactivo azul.

- Análisis en el espectrofotómetro

Se pesaron 70  $\mu$ L de las muestras y de los estándares respectivamente, se les añadió 1,4 mL de la solución del reactivo de color purpura. Se realizó la lectura a 562 nm de absorbancia en el espectrofotómetro (marca)

### **3.2.2.2. Método Dumas**

Determinación de nitrógeno/proteína en semilla de soja.

Utilizando un dispositivo adecuado, se debe triturar la muestra (comida o habas enteras) para obtener polvo fino (granulometría de aproximada de 0,5 mm), luego se mezcló bien antes de proceder al pesado, la cantidad debe ser de 50 mg de muestra homogénea.

Condiciones del análisis.



Se seleccionó una curva de calibración adecuada en función del intervalo de contenido de nitrógeno proteico de la muestra donde el rango sugerido de nitrógeno durante la curva de calibración es de 0-7 mgN

Ajustes

Factor de oxígeno mlO<sub>2</sub>/mg de muestra: 1,8

Caudal de oxígeno: (mlO<sub>2</sub> / min) 400

Factor de proteína (% N \* PF = % prot): 5,70

### 3.2.3. Cromatografía de intercambio iónico (FPLC).

Las proteínas de clara de huevo se separaron mediante IEX como se describe por **Recio et al., (1999)** con algunas modificaciones utilizando un sistema de FPLC con una columna de intercambio catiónico HiLoad 26/10 SP-Flow Sepharose Fast (Pharmacia) (**Rodríguez et al., 2012**). El disolvente A tuvo una concentración de 10 mM de hidrógeno carbonato de amonio el mismo que se acidificó a pH 7 con ácido fórmico, y el disolvente B fue 3 M de solución de amoníaco. El efluente se monitorizó a 280 nm. Cada serie cromatográfica se repitió 10 veces, y se agruparon las fracciones recogidas, se congelaron y se liofilizaron. Después, estas fracciones se analizaron RP-HPLC y SDS-PAGE.

### 3.2.4. Tratamiento térmico con microondas

Se realizó el calentamiento en el microondas de la lisozima de clara de huevo comercial y purificada a diferentes tiempos y potencias como: 30 y 60 segundos al 50 y 100 % de potencia en ambos casos. Una vez que las muestras fueron sometidas al proceso de calentamiento (microondas), estas fueron llevadas a digestión gástrica y duodenal *in vitro*, y actividades biológicas como enzimática y antioxidante.

### **3.2.5. Estudio de la digestión *in vitro* de la proteína de lisozima de clara de huevo**

#### **3.2.5.1. Simulación de la digestión gástrica *in vitro***

La preparación de las muestras consistió en pesar 5 mg de proteína comercial y aislada, para ser diluida con fluido gástrico simulado (SGF, NaCl 0.35 M) ajustados a diferentes pH: 1.2, 2.0 y 3.2 a 37 °C durante 60 minutos con 50 µL de pepsina porcina a una concentración de 4 500 U/mg de proteína. Para la comparación del efecto de la enzima en la hidrólisis de la proteína, también se trabajó con una relación enzima/sustrato de 1:20, w/w (2 000 U/mg) (**Jiménez et al., 2012; Carrillo et al., 2014**). Una vez que se detuvo la hidrólisis, en cada muestra se colocó 200 µL de bicarbonato a 90 °C por 5 minutos, deteniendo de esta manera la reacción enzimática. Se realizó tres réplicas por cada ensayo de digestión y se comparó con la técnica de electroforesis SDS-PAGE para comprobar la repetitividad de los resultados.

#### **3.2.5.2. Simulación de la digestión duodenal *in vitro***

Para el proceso de digestión duodenal se siguió el método descrito por **Jiménez et al., (2012)** con modificaciones. Los hidrolizados gástricos sometidos a 60 minutos de proceso de digestión fueron ajustados a pH 7, a los cuales se les añadió los siguientes elementos:

- Una mezcla de sales biliares 0,125 M que contenían cantidades equimolares de glicodesoxicolato de sodio y taurocolato de sodio (Sigma-Aldrich) con una concentración final de cada sal de 6,15 mM.
- CaCl<sub>2</sub> 1 M con una concentración final de 7,6 mM

- Pancreatina (100 U/mg) mezclada con Bis-Tris 20,3 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 120 minutos y se detuvieron por calentamiento a 80 °C durante 10 minutos, permitiendo de esta manera la desactivación de las enzimas. Los digeridos fueron analizados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

### **3.2.6. Análisis de la lisozima de clara de huevo de gallina mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

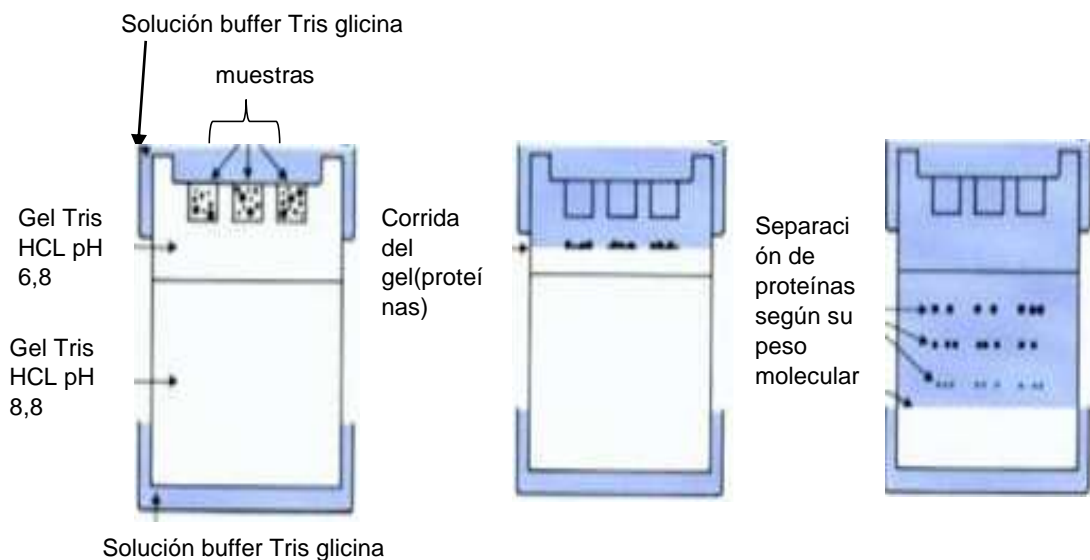
Para la caracterización de la proteína de lisozima de clara de huevo se empleó la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes utilizando el método descrito por **Laemmli, (1970)** con modificaciones. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 200 V durante 30 minutos en un buffer Tris- HCl usando un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), los geles fueron teñidos durante la noche en azul de coomassie y luego fueron desteñidos en una mezcla de metanol, etanol, ácido acético y agua destilada. Una vez que se obtuvieron los geles, estos fueron fotografiados digitalmente con un equipo Bio-Rad modelo ChemiDoc. Los geles se hicieron por duplicado para la interpretación de los resultados.

- Preparación

Se pesó 5 mg de proteína comercial de lisozima de clara de huevo, se añadió 1 mL de agua cuya mezcla se la realizó en el vortex, de la dilución obtenida se tomó 200 µl y se mezcló con 200 µl de buffer de muestra. Finalmente, la muestra se llevó a 90 °C durante 5 minutos.

- Geles

Se colocó en la placa de 1 mm de espesor el gel de abajo preparado a concentración de 16 %, una vez solidificado el gel, se agregó el gel de arriba preparado a la concentración del 12 %, seguidamente se añadió el peine para formar los pocillos, posteriormente se procedió a armar el equipo de electroforesis, luego en cada pocillo formado en el gel se colocó 30  $\mu$ l de la muestra preparada, se le agregó el buffer running dentro del equipo. Finalmente, los geles fueron llevados a una corrida eléctrica considerando los parámetros de voltaje y tiempo. A continuación, se explica de manera gráfica la corrida de los geles en la figura 2.



**Figura 2.** Descripción grafica de la corrida de geles con la solución de buffer, las muestras gel arriba con tris HCL a pH 6,8, gel abajo con Tris HCL pH 8,8 y la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular.

### 3.2.7. Evaluación de las actividades biológicas

#### 3.2.7.1. Evaluación de la actividad muramidasa

La actividad muramidasa natural de lisozima de clara de huevo se determinó espectrofotométricamente según la metodología descrita por **Shugar, (1952)** con ciertas modificaciones, incubando la lisozima con una suspensión de

paredes celulares de *Micrococcus lysodeikticus* que al hidrolizarse reducen la dispersión de la luz y se manifiesta en una reducción de la absorbancia a 450 nm. Se realizaron medidas cada minuto durante 6 minutos. Una unidad de lisozima se definirá como el decrecimiento de la absorbancia a 450 nm de  $0,001 \text{ min}^{-1}$ . Se prepararon tres soluciones:

- Solución tampón de fosfato potásico 66 mM a pH 6,24 a 25 °C.
- Solución de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus*, ATCC 4698 a una concentración de 0,015 % de (p/v)
- Solución de lisozima con 400 unidades/mililitro.

Se tomaron 2,5 mL de la solución de *Micrococcus lysodeikticus* y se adicionaron 0,1 mL de la solución de lisozima. Como control se emplearon una cubeta con 2,5 mL de la solución de *Micrococcus lysodeikticus* con 0,1 mL de tampón fosfato pH 6,24.

### **3.2.7.2. Citotoxicidad de la lisozima de clara de huevo de gallina y sus hidrolizados.**

El modelo peces cebras de la cepa AB (especie salvaje) fueron criados en un sistema de circulación de acuario. Peces cebras adultos se alimentaron a temperatura constante (26 °C) y fotoperíodo (16 horas luz: 8 horas oscuridad). Los machos y las hembras, en la proporción de 1:1, se colocaron en una caja de cultivo por separado con un plástico separador durante la noche del día anterior de la prueba. Al día siguiente, el apareamiento, desove y la fertilización se llevaron a cabo dentro de 30 minutos después de que se retira el plástico separador. Los huevos recogidos se transfirieron a cajas de petri con una pipeta pasteur. Los huevos fertilizados en las etapas de cuatro a ocho células fueron colocados en placas de 24 pocillos; cada pocillo contenía 2 mL de medio de ensayo con la muestra de proteína de lisozima de clara de huevo comercial y aislada. Los huevos fueron incubados durante 24 horas, pasado este tiempo se evaluó la supervivencia de los embriones. Las concentraciones ensayadas para la muestra de lisozima de clara de huevo fueron 5; 1; 0,1 y 0, 0,5 mg/mL. Se tomaron imágenes de los

embriones con la ayuda de microscopio estereoscopio con un cámara digital Moticom (5 MP). Mediante la cual se observarán efectos morfológicos que sufran dichas muestras en formación del embrión, el mismo que tendrá un control (peces con agua destilada) (Nagel, 2002; Spitsbergen et al., 2003).

### **3.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro***

#### **3.2.8.1. Evaluación de la actividad antioxidante en el modelo pez cebra (*Danio rerio*)**

Se utilizó el método de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico como se describe por **Westerfield, (1995)**. La colonia de pez cebra se estableció en el laboratorio, en un crecimiento o cristal del acuario del medio ambiente, provisto de filtro interno y carbón activado aireador para la oxigenación del agua. Las poblaciones de animales fueron alimentados tres veces al día con las virutas de alimento para peces. Los peces adultos se mantuvieron en ciclos de 16 horas de oscuridad y 10 horas de luz. Los embriones se obtendrán por desove foto-inducida sobre las plantas verdes y se cultivaron a 28 °C en agua tanque de peces. Las larvas de 5 días post fecundación (dpf), fueron incubadas en placas de 24 pocillos, 30 larvas por pocillo para cada 100 mg/mL de los lisosomas e hidrolizados. La peroxidación lipídica fue iniciada añadiendo 1 ml 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fue incubada durante 24 horas a 28 °C. Grupos de 30 larvas/pocillo en el agua del acuario se utilizaron como controles. Entonces se retiraron el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se añadió 500 µl de Tween 0,1 %. Cada grupo fue mezclado y homogeneizado con un Ultra Turrax T25 de IKA, después de la absorbancia se midieron a 532 nm y la disminución de la absorbancia indico un aumento de la actividad antioxidante. Los valores de actividad antioxidante fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica en homogeneizado de larvas, empleando la siguiente ecuación:

% total de la actividad antioxidante de inhibición de la peroxidación lipídica

$$= \frac{Ab - As}{Ab} \times 100$$

Ecuación 1

Dónde:

Ab= Absorbancia del control

As= Absorbancia de la muestra

La prueba de las larvas fue controlada usando un microscopio con Motic Moticam 580 de 5 MP.

### **3.2.8.2. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante el método TBARS**

Se pesaron 0,4; 0,8; 2; 4 mg de lisozima purificada, comercial y BHT la cual se disolvió en 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mili-Q)

Se midió 500 µL de muestra con 500 µL de aceite oxidado, luego se llevó a 28 °C por el lapso de 8 horas. Se preparó los controles con 1ml de aceite oxidado y aceite no oxidado, se les añadió 1 mL de TBAR para luego ser llevados a 95 °C por 60 minutos, después mantenerla en refrigeración para posteriormente realizar la lectura en el espectrofotómetro con una absorbancia de 532 nm. Para calcular el porcentaje de actividad antioxidante se aplicará la ecuación número 1.

### **3.2.9. Análisis RP-HPLC & UHPLC**

Los hidrolizados de lisozima, a una concentración de 2,0 mg/mL, se analizaron mediante un Hi-Pore® RP-318 (250 x 4,6 mm de diámetro interno) de columna (Waters, Milford, MA) en un sistema de HPLC Waters 600 y UHPLC columna EC-C18 (Agilent 1200 infinity, technologies, Waldbron, Germany, poroshell 120. 4,6 \* 50 MM \* 2,7 µm de tamaño de partícula). El disolvente A fue de 0,27 % (v/v) de ácido trifluoroacético

(Scharlau Chemie, Barcelona, España) en agua doblemente destilada y disolvente B fue de 0,37 % (v/v) de ácido trifluoroacético en acetonitrilo grado HPLC (Lab-Scan, Gliwice, Polonia). Las condiciones cromatográficas fueron como en **Martos et al., (2010)**. La detección se realizó a 220 nm y los datos fueron procesados mediante el uso de Empower 2 Software (Waters).



## 4. CAPÍTULO

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1. Purificación de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina.

A partir de la clara de huevo de gallina mediante precipitación con 1 % de NaCl. Se obtuvo lisozima con carga positiva. Usando este método se logró obtener 33 g de proteína de lisozima de clara de huevo de gallina a un pH 7. Cabe recalcar que la lisozima de la clara de huevo de gallina es una proteína con un alto punto isoeléctrico ( $pI=10,7$ ) en condiciones fisiológicas a pH 7,0; la lisozima de clara de huevo tiene carga positiva, a pH mayor a 10,7 tiene carga negativa. La clara de huevo de gallina tiene diferentes proteínas como ovoalbúmina ( $pI=4,5$ ), ovotransferrina ( $pI=6,0$ ) y ovomucina ( $pI=4,1$ ), todas estas con un punto isoelectrico menor a pH 7; por ello poseen carga negativa (Chiu et al., 2007).

##### 4.1.2. Cuantificación de la proteína purificada de lisozima de clara de huevo de gallina por el método BCA y Dumas.

Una vez obtenida el precipitado proteico usando NaCl %. Se procedió a cuantificar el contenido de proteína usando el método del BCA (ácido bicinonínico) y el método Dumas.

Se usó como control lisozima de clara de huevo de grado estándar de la casa comercial sigma. Este estándar se usó para todos los ensayos de este estudio.

**Tabla 2.** Resultados de la concentración de proteína (mg/g) de lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial.

Muestra	Concentración de proteína (mg/g)
Purificada	58,85 ± 1,04 <sup>b</sup>
Comercial	108,64 ± 11,01 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como P<0,05 usando un ANOVA y test tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

Para el método del BCA se usó una curva estándar de BSA (Albumina Serina Bovina) a diferentes concentraciones una vez graficadas las absorbancias obtenidas a 562 nm. Como se puede observar en la tabla N°2 existe un máximo contenido de proteína en la lisozima comercial de clara de huevo fue de 108,6 % a diferencia de la proteína purificada a pH 7,0 fue de 58,8 %. La purificación de lisozima de clara de huevo de gallina presentó cuatro péptidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) los mismos que dan la coloración característica en los ensayos del BCA (**García et al., 1998**). También para su cuantificación se aplicó el método Dumas el mismo que dio un 44 % de proteína

#### **4.1.3. Purificación de lisozima de clara de huevo mediante cromatografía de intercambio iónico (FPLC)**

La separación de lisozima de clara de huevo de gallina se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico. En esta técnica se usó una columna que tiene un relleno con carga negativa solo se unen las proteínas que tienen carga positiva. Para separar estas proteínas de la columna se usan solventes que cambien la carga de la proteína debido al pH de la solución. Como solvente B se usó una solución 3 M de amoniaco aportando un pH de 14. Como la lisozima tiene un punto isoelectrico de 10,7. La lisozima se carga negativamente y se libera de la columna. Mediante un detector con longitud de onda a 220 nm se puede registrar todo el proceso.

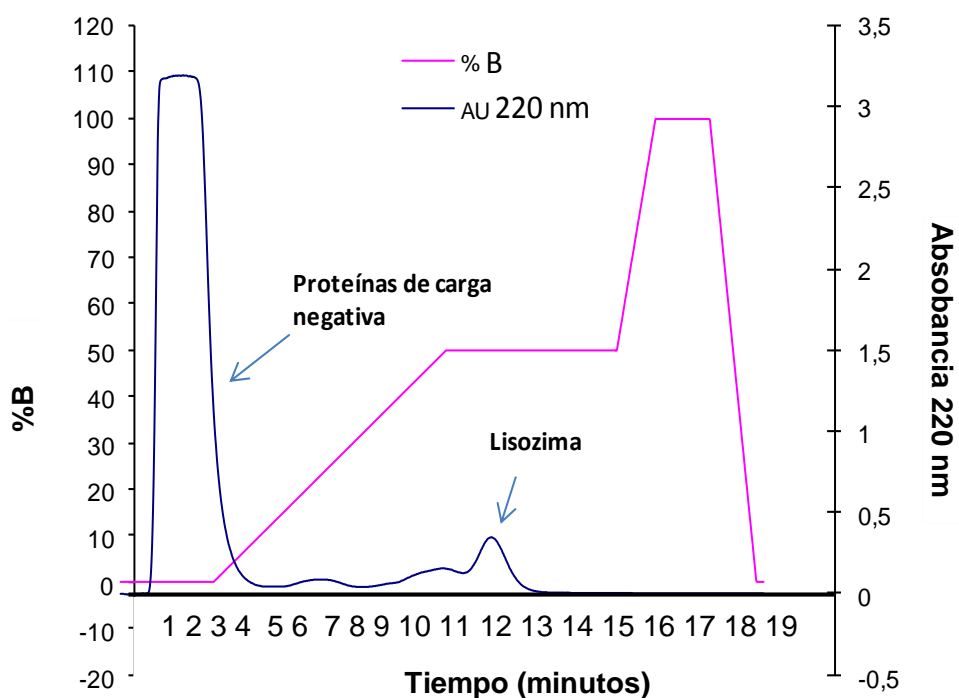


Figura 3. Separación de lisozima de clara de huevo por cromatografía de intercambio iónico.

La lisozima comercial fue cargada en las mismas condiciones del análisis de la lisozima aislada. Este estándar permitió confirmar el tiempo de retención de la lisozima de clara de huevo de gallina. Efectivamente el pico identificado coincidió con la muestra obtenida de la clara de huevo de gallina. Se localizó a la lisozima incrustada en la columna por afinidad de carga, al existir un incremento del pH el porcentaje de la concentración de amoníaco aumentó, al sufrir un cambio del pH, el punto isoeléctrico de la lisozima de clara de huevo de gallina cambia de su carga positiva a carga negativa respectivamente. En la lisozima de clara de huevo de gallina existen diferencias de carga debido a su punto isoeléctrico (pI), el mismo que permite separar la clara de huevo de gallina a través de cromatografía de intercambio catiónico (Chiu et al., 2007).

#### **4.1.4. Análisis de la lisozima de clara de huevo de gallina mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) llevados a digestión gástrica y duodenal *in vitro***

##### **4.1.4.1. Simulación de la digestión gástrica *in vitro***

Los hidrolizados fueron analizados mediante electroforesis SDS-PAGE encontrándose que la lisozima hidrolizada a pH 1,2 fue totalmente hidrolizada por reacción de la pepsina durante todos los ensayos. En el gel de poliacrilamida no se detectó la banda correspondiente a 14 400 Da de la lisozima a pH 1,2. Pero si se identificó una banda de bajo peso molecular de 6 500 Da que corresponde a los péptidos producto de la hidrólisis.

A pH 2,0 la lisozima fue parcialmente hidrolizada por la pepsina. Se encontró en el gel de poliacrilamida la banda de 14 400 Da correspondiente a la lisozima. También se identificó la banda de 6 500 Da de péptidos producto de la hidrólisis parcial de la pepsina. Mientras que a pH 3,2 la lisozima no fue hidrolizada por la pepsina. Se observó la banda de 14 400 Da intacta al compararla con la lisozima control sin pepsina (figura 4).

Este comportamiento de hidrolisis a pH 1,2; 2,0 y 3,2 ocurrió a todos los tiempos ensayados en este estudio que fueron 60, 90 y 120 minutos de incubación con la enzima.

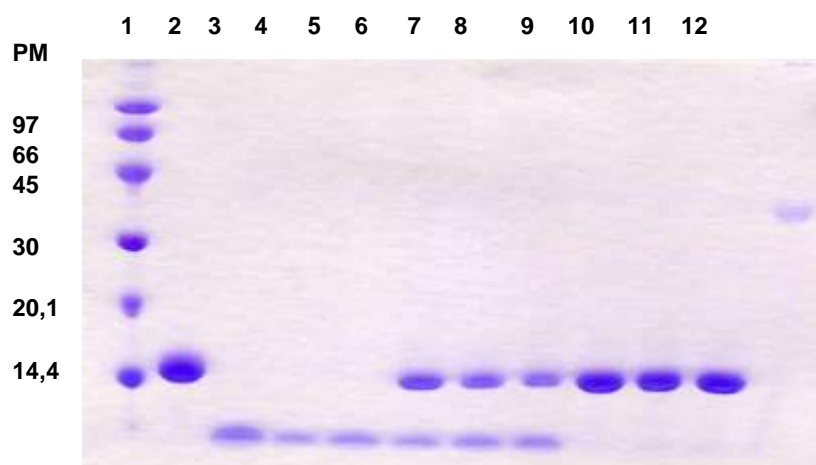


Figura 4. análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima sin pepsina, pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 1,2 (60 minutos), pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 1,2 (90 minutos), pocillo 5: lisozima con pepsina a pH 1,2 (120 minutos), pocillo 6: lisozima con pepsina a pH 2,0 (60 minutos), pocillo 7: lisozima con pepsina a pH 2,0 (90 minutos), pocillo 8: lisozima con pepsina a pH 2,0 (120 minutos), pocillo 9: lisozima con pepsina a pH 3,2 (60 minutos), pocillo 10: lisozima con pepsina a pH 3,2 (90 minutos), pocillo 11: lisozima con pepsina a pH 3,2 (120 minutos) y pocillo 12: pepsina en blanco.

Lisozima de clara de huevo es un potente alérgeno llamado Gal d4 con la resistencia a la hidrólisis con pepsina. En este estudio, la lisozima fue totalmente hidrolizada con pepsina a pH bajos. Sin embargo, se ha descrito recientemente que lisozima a pH 1,2 tiene total susceptibilidad a la hidrólisis con pepsina (**Polverino de Laureto et al., 2002; Ibrahim et al., 2001**). **Fu et al., (2002)** han informado de que la lisozima de clara de huevo resistió más de 60 minutos a pH 1,2, en una relación E: S de (13:1) w/w. **Thomas et al., (2004)** describe que la lisozima de clara de huevo es resistente a la hidrólisis con pepsina a pH 2,0. **Ibrahim et al., (2005)** encontraron que 40 % de la lisozima original se hidroliza después de 120 minutos de digestión a una relación E: S 1:50 (w/w) a pH 4,0.

Además, se analizó en SDS PAGE la lisozima de clara de huevo comercial y purificado sometidas a hidrólisis gástrica a diferentes pHs como 1,2; 2,0 y 3,2 sin dependencia del tiempo, sino de muestras. Como se puede observar en la figura 5 a pH 1,2 la lisozima de clara de huevo comercial fue totalmente digerida, a diferencia de los pHs 2,0 y 3,2 que no fueron digeridos, lo que es un indicativo de que a estos pHs son resistentes a la pepsina.

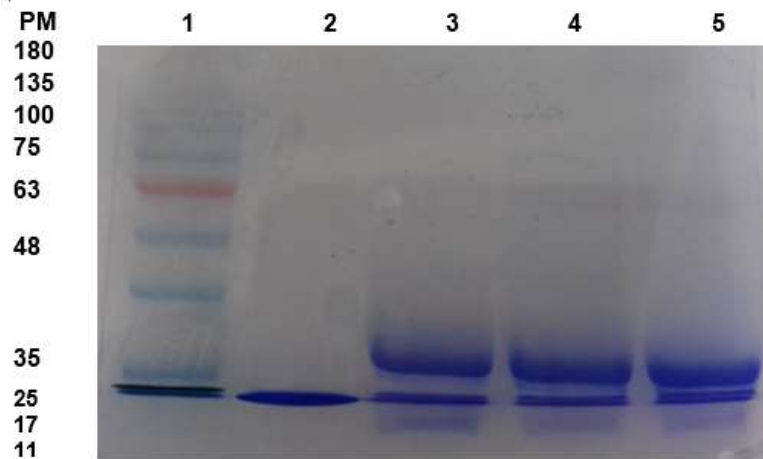


Figura 5. análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo comercial hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima con pepsina a pH 1,2; pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 2,0; pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2; pocillo 5: lisozima comercial sin pepsina

La figura 6 a pH 1,2 la lisozima de clara de huevo de gallina purificada fue totalmente digerida, a diferencia de los pHs 2,0 y 3,2 que no fueron digeridos, lo que es un indicativo de que a estos pHs son resistentes a la pepsina. En el gel de poliacrilamida se puede confirmar la presencia de la banda que corresponde con el peso molecular de 14 400 kDa de la lisozima de clara de huevo pero también hay presencia de una banda muy abundante con un peso de 35 kDa y otra banda con un peso de 75 kDa respectivamente.

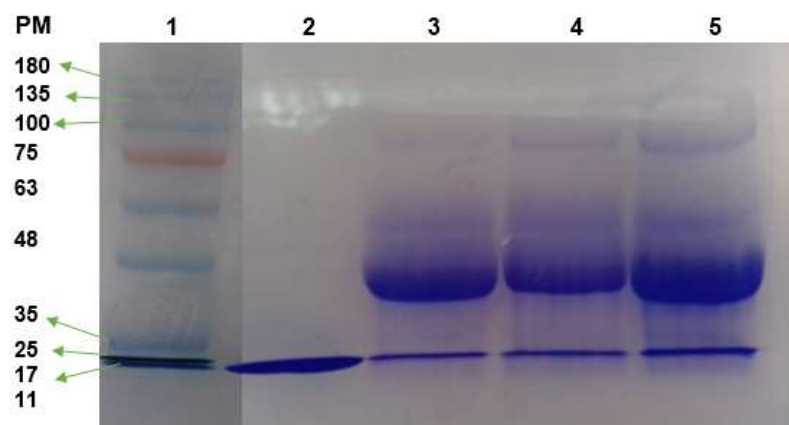


Figura 6. análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo aislada hidrolizada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima con pepsina a pH 1,2; pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 2,0; pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2; pocillo 5: lisozima aislada sin pepsina.

#### 4.1.4.2. Digestión duodenal *in vitro*

La digestión duodenal se realizó en dos pasos, el primero fue la digestión gástrica con pepsina a pH 3,2, en 60 minutos a una temperatura de 37 °C, el segundo fue la digestión duodenal con 1 mL de la digestión gástrica y 1 mL de la solución de pancreatina a pH 7,0 por 120 minutos a la misma temperatura. Lo anteriormente mencionado fue realizado con la lisozima de clara de huevo comercial y la aislada.

Como se observa en la figura 7 la lisozima de clara de huevo de gallina comercial fue totalmente digerida en el pocillo 4 no existe rastros de la proteína luego de la digestión duodenal, a diferencia del pocillo 1 donde existe presencia de la proteína ya que esta no fue sometida a ninguna digestión.

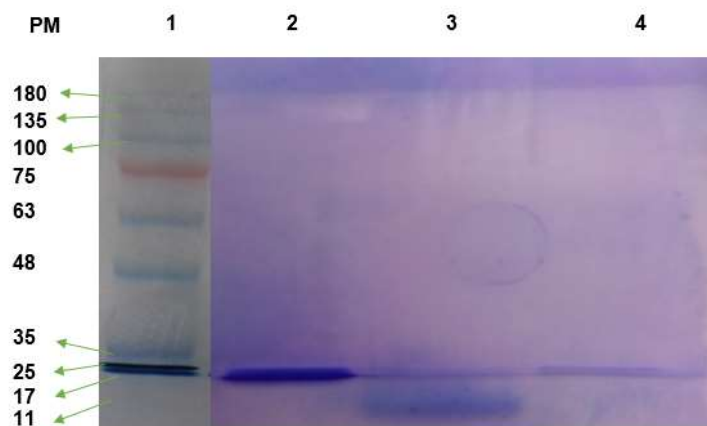


Figura 7. análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo de gallina comercial. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima sin pepsina, pocillo 3: lisozima con pepsina a pH 3,2, pocillo 4: digestión duodenal.

La lisozima de clara de huevo de gallina purificada fue sometida a digestión duodenal, como se observa en la figura 8 dicha lisozima fue totalmente digerida en el pocillo 4 no existe rastros de la proteína luego de la digestión duodenal a pH 3,2, a diferencia del pocillo 1 donde existe presencia de la

proteína ya que esta no fue sometida a ninguna digestión y en el pocillo 3 presenta rastros de proteína en la digestión gástrica al mismo pH.

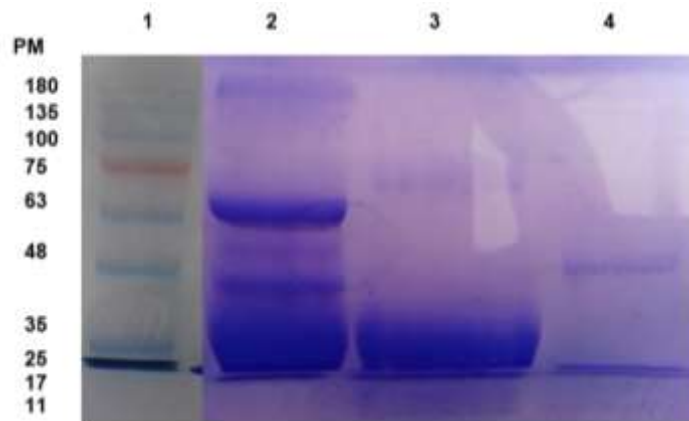


Figura 8. análisis de electroforesis en SDS-PAGE de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada. pocillo 1: peso molecular, pocillo 2: lisozima de clara de huevo de gallina purificada sin pepsina, pocillo 3: lisozima de clara de huevo de gallina con pepsina a pH 3,2, pocillo 4: lisozima con pepsina a pH 3,2 (120 minutos).

#### 4.1.5. Evaluación de las actividades biológicas por tratamiento térmico.

##### 4.1.5.1. Evaluación de la actividad muramidasa

La lisozima de clara de huevo de gallina es una enzima con la capacidad de hidrolizar las paredes bacterianas de bacterias Gram – positivas. En este estudio se evaluó la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada mediante precipitación, lisozima modificada por hidrolisis y tratamiento térmico con microondas. La actividad enzimática se ensayó para determinar el grado de hidrólisis gástrico a pH 1,2, 2,0 y 3,2. La enzima lisozima de clara de huevo de gallina necesita su sitio activo para unirse al sustrato. El sitio puede ser modificado a través de hidrólisis con pepsina. La actividad residual se evaluó con el método espectrofotométrico a 450 nm con una solución de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. En la figura 9 se puede observar que la lisozima de clara de huevo hidrolizada a pH 1,2 a 60 minutos no tiene actividad enzimática y sólo se conserva 1,7% de su actividad natural. A pH 2,0, durante 60 minutos, la lisozima hidrolizada



conserva 45% de su actividad enzimática. A pH 3,2, la lisozima de clara de huevo de gallina hidrolizada conserva 98% de su actividad enzimática en comparación con el control de la misma

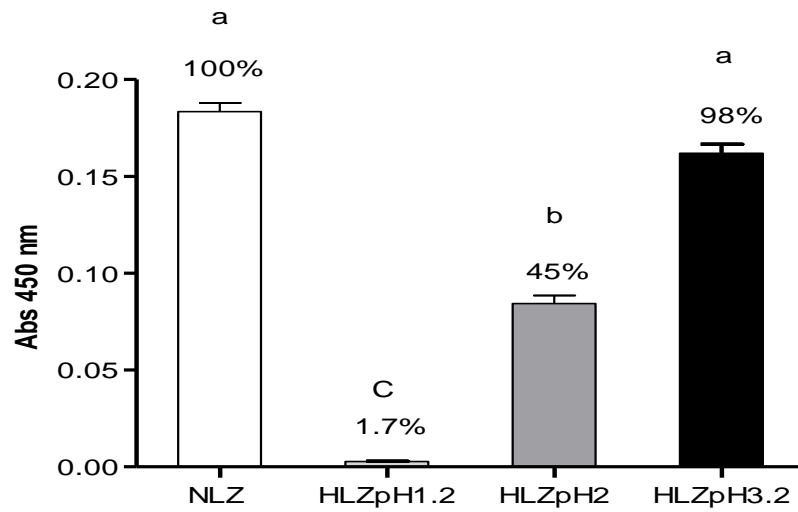


Figura 9. la actividad enzimática residual de la lisozima de clara de huevo, hidrolizados de lisozima con pepsina a pHs 1,2, 2,0 y 3,2 durante 60 minutos.

En la figura 10 se puede observar que a los 90 minutos los hidrolizados presentaron una actividad enzimática residual con valores de 0,8 %, 38 %, y 90 % a pH 1,2; 2,0 y 3,2, respectivamente.

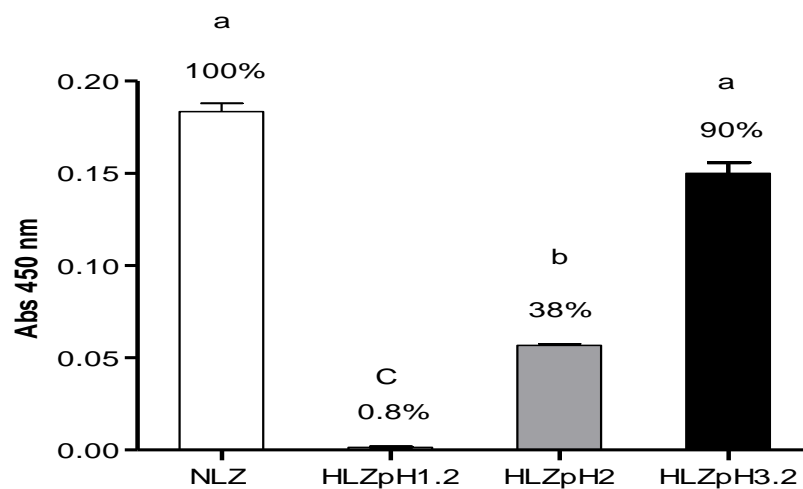
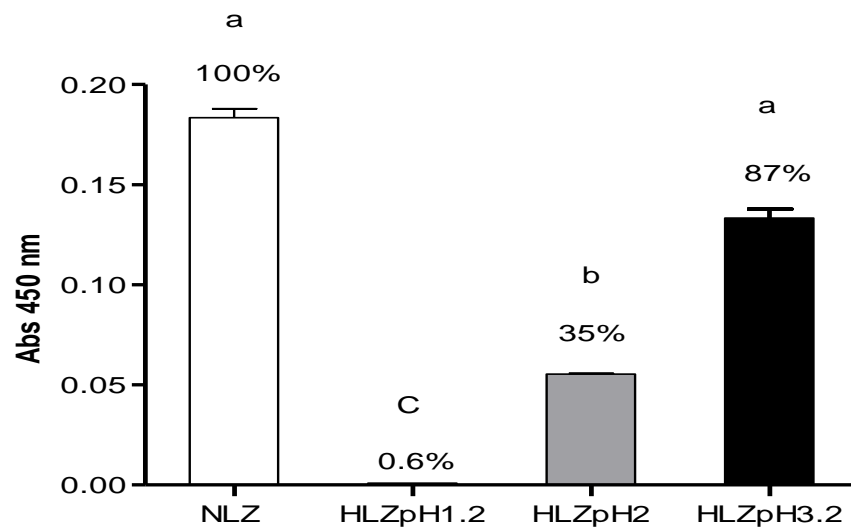


Figura 10. hidrolizados de lisozima con pepsina a pHs 1,2 ; 2,0 y 3,2 durante 90 minutos.

Los hidrolizados de lisozima de clara de huevo durante 120 minutos presentaron una actividad enzimática residual con valores de 0,6%, 35% y 87% a pH 1,2; 2,0 y 3,2, respectivamente como se encuentra ilustrado en la figura 11 dichos resultados muestran que la actividad enzimática fue proporcional al tiempo de hidrólisis con pepsina.



**Figura 11. hidrolizados de lisozima con pepsina a pH 1,2; 2,0 y 3,2 durante 120 minutos.**

Como se puede observar en la figura 12 la lisozima de clara de huevo comercial presenta un 100 % de actividad muramidasa en comparación con la lisozima de clara de huevo purificada mediante cromatografía de intercambio iónico (FPLC) la misma que presento un 97% de actividad muramidasa. Por otra parte, la lisozima de clara de huevo comercial sometida a hidrólisis gástrica presento un 17% a diferencia de la lisozima de clara de huevo purificada que solo presento un 2% de la misma actividad, con estos valores se puede añadir que al ser sometidos a hidrólisis gástrica la lisozima se reduce en fragmentos pequeños por lo que no presenta actividad muramidasa. Dichos resultados están de acuerdo con diferentes estudios en los que se ha descrito que la lisozima hidrolizada no tiene actividad muramidasa. **Mine et al., (2004)** ha descrito que el hidrolizado de lisozima con actividad antimicrobiana sin actividad muramidasa. Por otro lado, **You et al., (2010)**, describió hidrolizados y

péptidos de lisozima sin actividad muramidasa. Otros autores como **Ibrahim et al., (2005)** también han descrito el hidrolizado de lisozima de clara de huevo con actividad antibacteriana, pero sin actividad muramidasa.

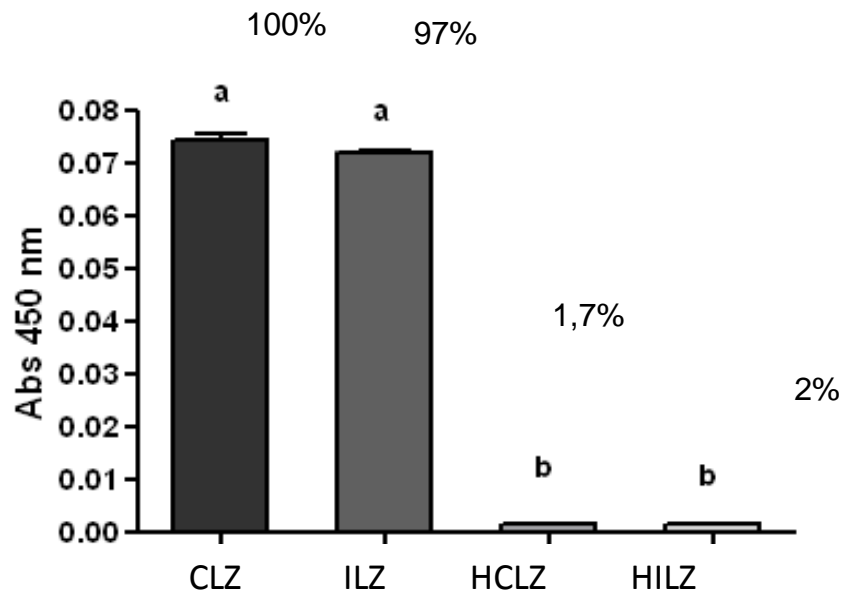
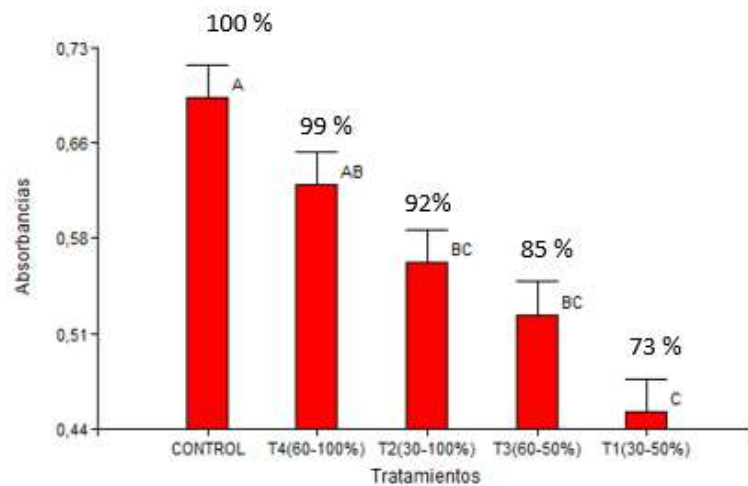


Figura 12. actividad muramidasa residual de lisozima comercial (CLZ), lisozima de clara de huevo aislada (ILZ), hidrolizado de lisozima comercial (HCLZ) e hidrolizado de lisozima de clara de huevo aislada (HILZ). La disminución de la turbidez de una suspensión de células de *Micrococcus lysodeikticus* se determinó a 450 nm en tampón fosfato a pH 6,24 y 25 °C.

Además, la actividad enzimática fue evaluada mediante el uso de tratamiento térmico con microondas. El uso del microondas en este estudio tiene una gran ventaja de rapidez y penetración de calentamiento, así como también un ahorro de energía y mejora de la calidad. Además, la absorción de energía y el calentamiento de los alimentos se presentan de mejor manera a bajas frecuencias (**Oliveira et al., 2002**). En este caso se utilizó el 50 y 100 % de potencia del microondas a 30 y 60 segundos respectivamente. Dichas muestras fueron sometidas a análisis de actividad enzimática.

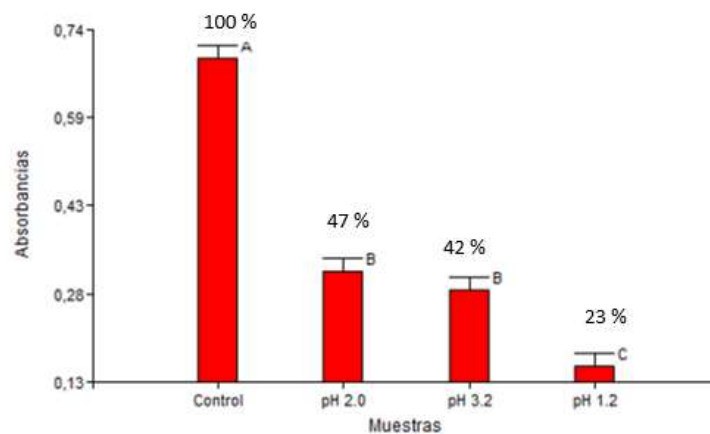
Las actividades enzimáticas de los tratamientos empleados se ven reflejadas con respecto a la medida de las absorbancias como se observa en la figura 13. El control con el tratamiento 2,3 y 4 no presentan

diferencias significativas en las absorbancias medidas, sin embargo, el tratamiento 1 es diferente al control y al tratamiento 4 presento un 99 % de actividad enzimática a diferencia del tratamiento 1 el cual fue de 73 %, los tratamientos 2 y 3 también presentan diferencias significativas para el control con 92 % y 85 % respectivamente.



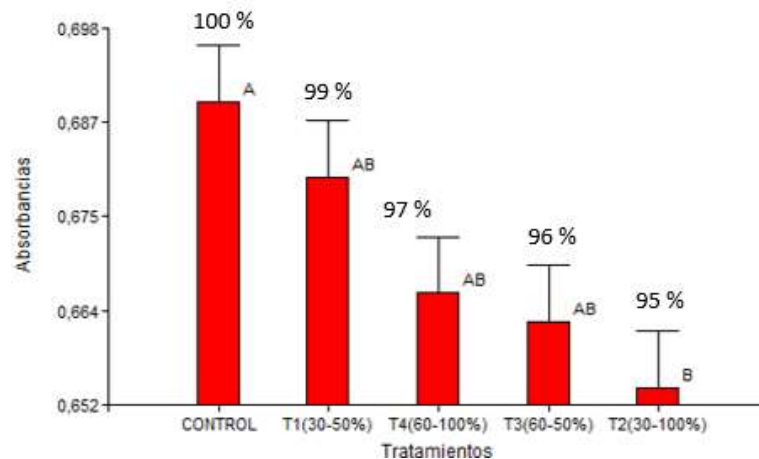
**Figura 13.** actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo comercial donde T4 está representado a 60 segundos con 100 % de potencia, T2 30 segundos a 100 % de potencia, T3 60 segundos a 50 % de potencia, T1 30 segundo a 50 % de potencia en el microondas respectivamente a los dos minutos.

Como se puede observar en la figura 14 la actividad enzimática en las muestras de lisozima sometidas a hidrolisis a pH 1,2 presento un 23 % con respecto al control con un 100 %, a diferencia del pH 2 y 3,2 con valores similares de 47 % y 42 % respectivamente, en un lapso de 2 minutos.



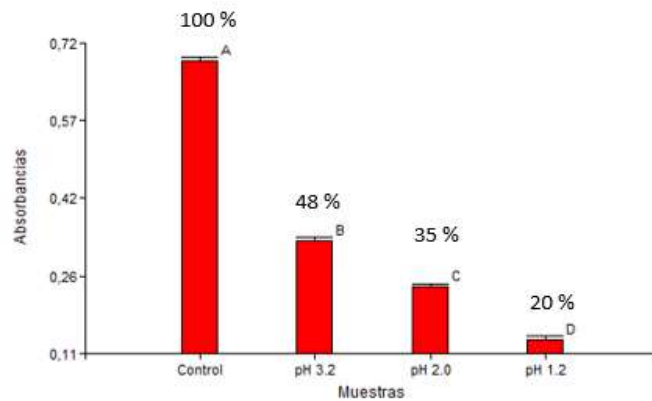
**Figura 14.** actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo comercial sometida a hidrolisis gástrica a pH 1,2; pH 2,0; pH 3, a los dos minutos.

La lisozima de clara de huevo de gallina purificada (aislada), también fue sometida a la evaluación de la actividad enzimática luego del tratamiento térmico (microondas). Como se observa en la figura 15 la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina fue de 99 % en el tratamiento 1, en el tratamiento 4 con un 97%, al igual que el tratamiento 3 con un 96% y finalmente en el tratamiento 2 con un 95 % de actividad enzimática respectivamente, todo esto en el lapso de dos minutos.



**Figura 15. actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo purificada donde T4 está representado a 60 segundos con 100 % de potencia, T2 30 segundos a 100 % de potencia, T3 60 segundos a 50 % de potencia, T1 30 segundo a 50 % de potencia en el microondas respectivamente a los dos minutos**

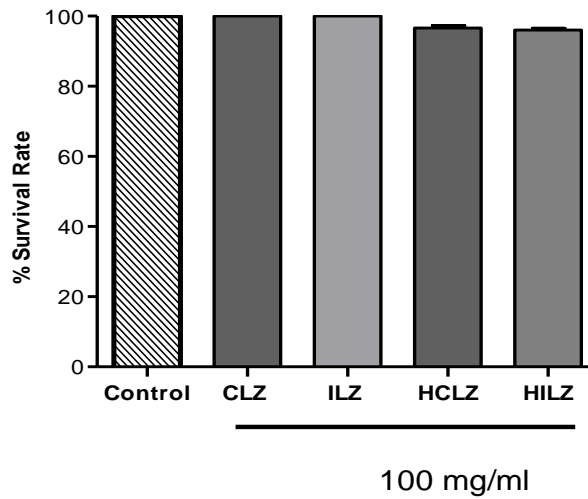
Además, la actividad enzimática se midió luego de haber sometido las muestras a una hidrólisis gástrica a diferentes pH como son 1,2; 2,0 y 3,2 de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada a 2 y 6 minutos. Como se puede observar en la figura 16 la actividad enzimática en las muestras hidrolizadas presentaron valores de actividad de 20 % a pH 1,2; a diferencia de los pHs 2,0 con 35 % y a pH 3,2 un 48 % de actividad enzimática respectivamente.



**Figura 16.** actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrólisis gástrica a pH 1,2; pH 2,0; pH 3, a los dos minutos.

#### **4.1.5.2. Citotoxicidad de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina en el modelo pez cebra (*Danio rerio*).**

La citotoxicidad de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina comercial fue analizada mediante el modelo pez cebra (*Danio rerio*) en el lapso de 24 horas. Se lo midió en un esteromicroscopio, dando como resultado la resistencia del pez a dicho análisis, comprobando con ello que la lisozima de clara de huevo comercial no causa ningún efecto toxico luego de su consumo. En la figura 17 se puede observar que no existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia de los embriones de pez cebra, en la lisozima comercial, purificada y en ambos casos sometidas a hidrólisis.



**Figura 17. tasa de supervivencia de los embriones de pez cebra expuestos con varias concentraciones de lisozimas durante 48 horas.**

Se analizaron las morfologías en los embriones del pez cebra, estos no presentan ninguna clase de deformaciones evidentes, dichas deformaciones pueden ser la coagulación de huevo, la falta de somitas de desarrollo, la falta de desprendimiento de la cola, la falta de latido del corazón se comprobó que los embriones fueron normales como se puede visualizar en la figura 18



control



muestra

**Figura 18. Fotografía de huevo de pez cebra después de 48 horas de incubación con lisozima de clara de huevo.**

### 4.1.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro*

#### 4.1.5.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante modelo pez cebra (*Danio rerio*)

En la figura 19, se puede observar que la lisozima comercial y purificada por cromatografía sólo fueron capaces de inhibir la peroxidación lipídica en larvas de pez cebra fue del 21 % y 23 % respectivamente, mientras que la lisozima hidrolizada presentó una alta actividad, siendo capaz de inhibir 82 % de la lisozima comercial hidrolizada y 84 % para la lisozima aislada a través de cromatografía de intercambio catiónico. Tanto la lisozima hidrolizada y aislada fueron eficaces y no existe diferencias significativas.

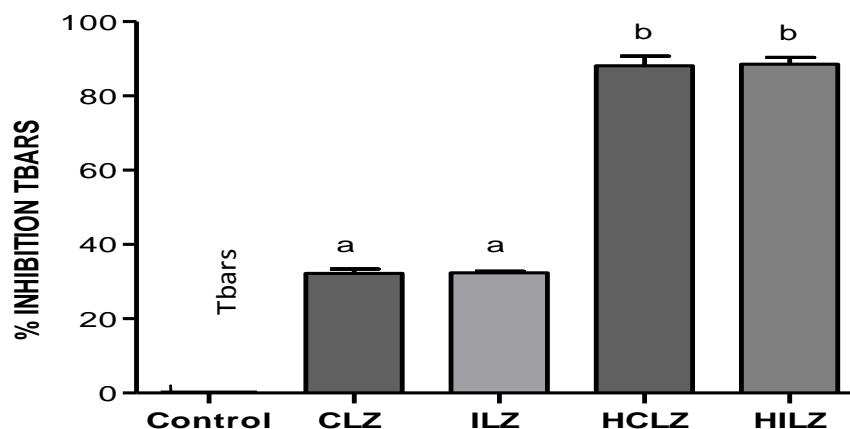
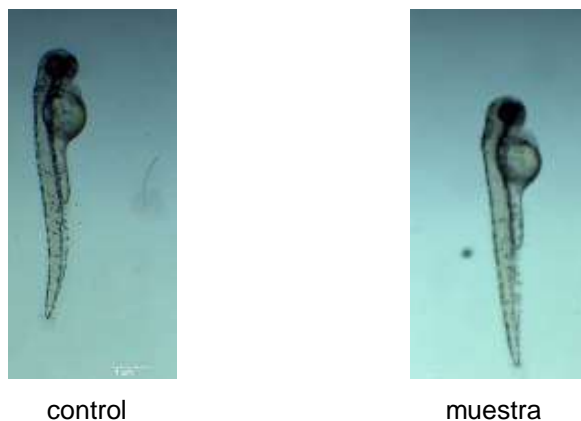


Figura 19. los resultados Tbar de lisozima. los datos se expresan como la inhibición de TBARS % en comparación con un control negativo (las barras de error expresan como  $\pm$  SD). n=30 larvas de pez cebra. lisozima comercial (CLZ), lisozima aislada (OSR), hidrolizado de lisozima comercial (HCLZ) e hidrolizado de lisozima aislada (HILZ).

Las larvas de pez cebra después de 24 horas se examinaron y no se encontraron ninguna clase de anomalías morfológicas visibles como cuerpos torcidos, deformaciones de la columna como se puede observar en la figura 20.

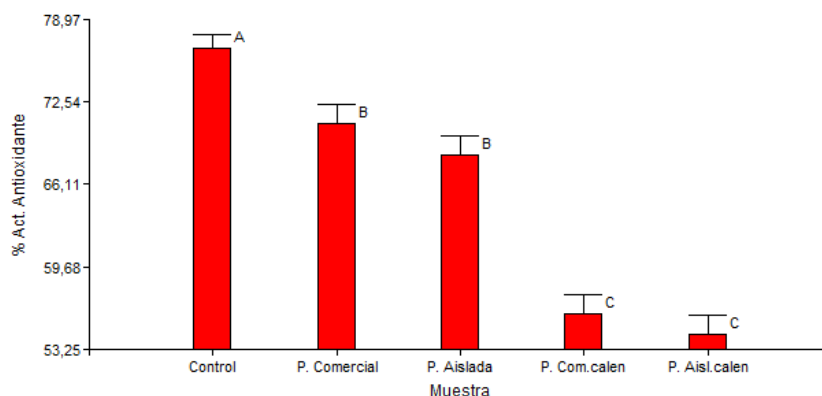




**Figura 20. Morfologías de larvas de pez cebrá después de la incubación con lisozima.**

#### 4.1.5.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

La lisozima de clara de huevo de gallina tanto purificada y comercial fueron sometidos a actividad antioxidante, con un control positivo BHT. Como se puede observar en la figura 21 los resultados de la actividad antioxidante en la lisozima comercial presento un 72 %, sin diferencia significativa con la lisozima de clara de huevo de gallina purificada con un valor de 69 % de actividad, presentando una diferencia significativa en relación al control positivo el cual fue el BHT. Las muestras calentadas en el microondas tanto comercial y purificada presentaron actividad antioxidante con 58 y 54 % respectivamente



**Figura 21. los resultados Tbar de lisozima de clara de huevo de gallina representado como % de actividad antioxidante con un control positivo (BHT), lisozima de clara de huevo comercial, lisozima de clara de huevo purificada, lisozima de clara de huevo comercial y aislada sometida a calentamiento.**

#### 4.1.6. Análisis RP-HPLC

Los hidrolizados de lisozima de clara de huevo de gallina fueron analizados mediante RP-HPLC. Se inyectó lisozima comercial de grado estándar a 1mg/mL. En la figura 22 se puede observar que aparece un solo pico bien definido con un tiempo de retención de 7,8 minutos. Este tiempo de retención permite identificar la presencia de lisozima en todos los ensayos. El análisis de RP- HPLC de hidrolizados de lisozima de clara de huevo durante 60 minutos muestra que la lisozima fue totalmente hidrolizada a pH 1,2; a diferencia del pH 2,0 donde solo existió una hidrólisis parcial y a pH 3,2 la hidrólisis no se observó. Estos resultados fueron similares en todos los tiempos experimentales.

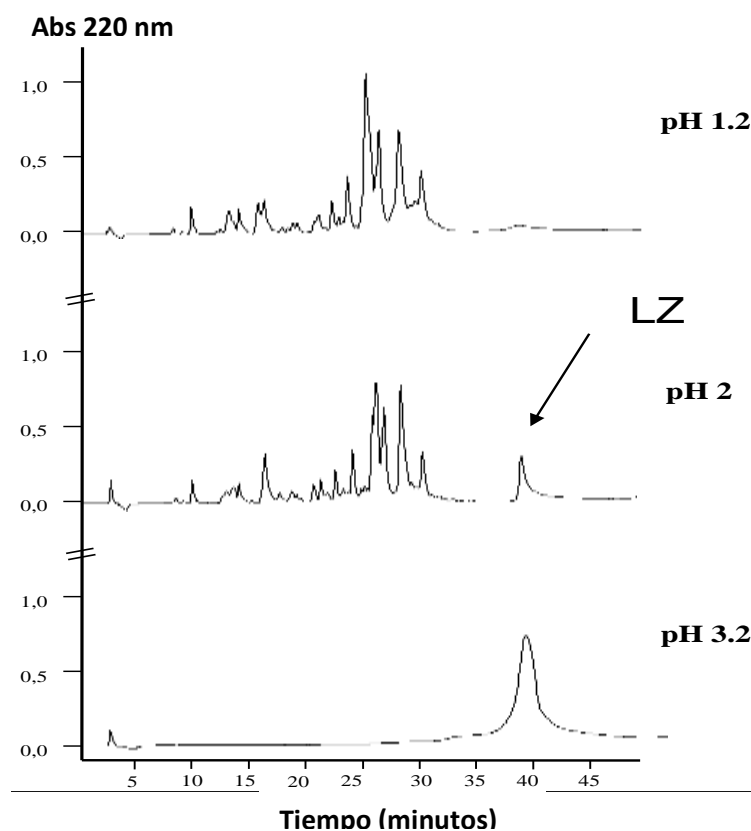
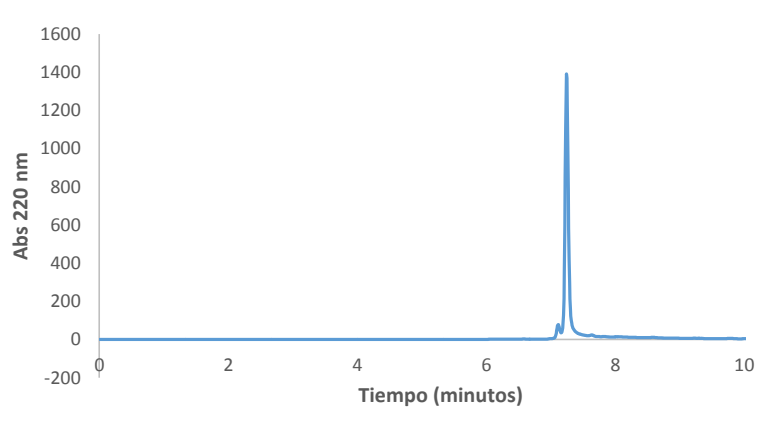


Figura 22. Análisis en RP-HPLC de hidrolizados de lisozima de clara de huevo durante 60 minutos.

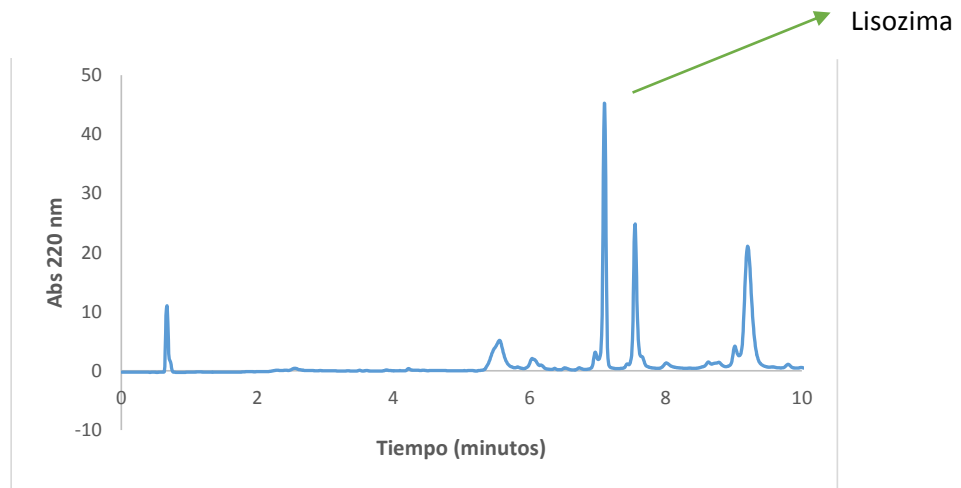
#### 4.1.6.1. Análisis UHPLC

El análisis de la lisozima de clara de huevo de gallina tanto comercial la misma que fue sometida a análisis U-HPLC donde se pudo observar la presencia de lisozima a un tiempo de 7 minutos en forma de un pico alto, este determino la presencia de la proteína como la lisozima de clara de huevo de gallina comercial como se observa en la Figura. 23.



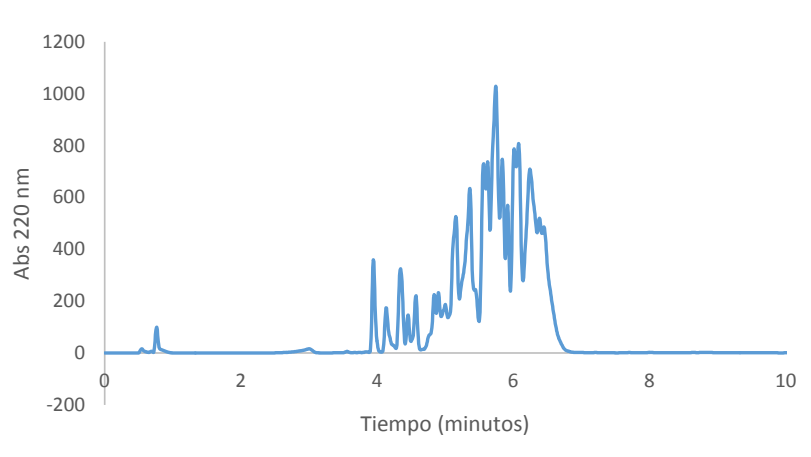
**Figura 23 Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina comercial sin hidrolizar.**

La lisozima de clara de huevo de gallina purificada también fue analizada mediante U-HPLC como se observa en la figura 24 presentó varios picos, los mismos que determinan presencia de otros tipos de proteínas en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada, cabe señalar que si existe el pico más alto el cual determina la presencia de dicha proteína en tiempo de retención de 7 minutos.



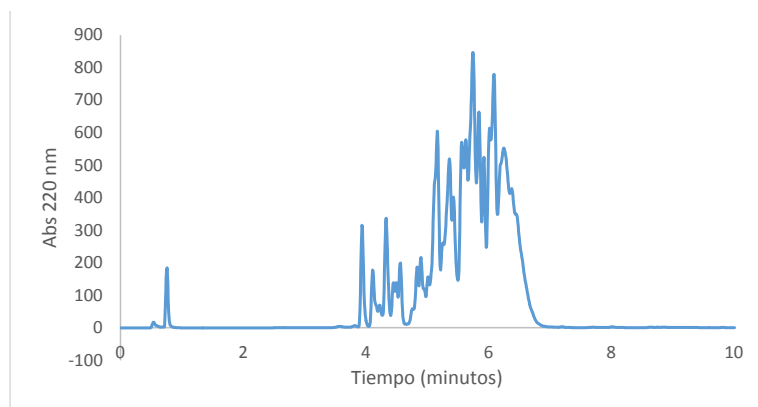
**Figura 24** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada sin hidrolizar.

Además, se realizó el análisis de las muestras hidrolizadas de la lisozima de clara de huevo de gallina comercial a diferentes pHs, mediante el U-HPLC donde se puede observar que el pico de la lisozima de clara de huevo de gallina fue totalmente hidrolizado con pepsina a un pH 1,2 (Figura. 25).



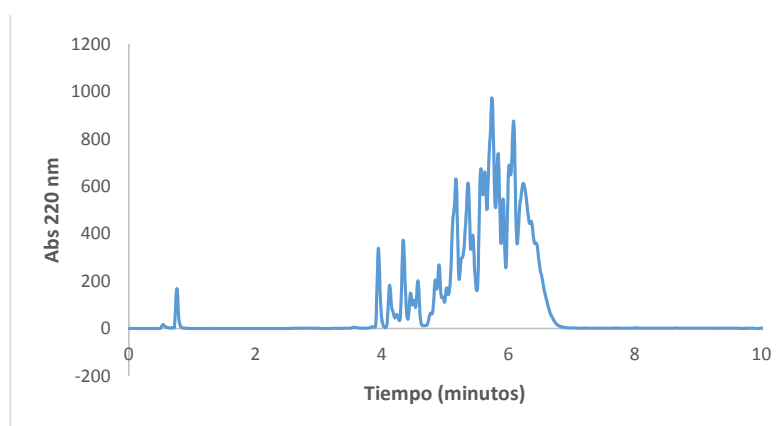
**Figura 25** Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina comercial hidrolizada a pH 1,2 con pepsina.

Como se puede observar en la figura 26 mediante el análisis U-HPLC la lisozima de clara de huevo de gallina comercial hidrolizada a pH 2,0 no presenta el pico característico de la lisozima de clara de huevo, lo que es indicativo que la pepsina la digirió totalmente.



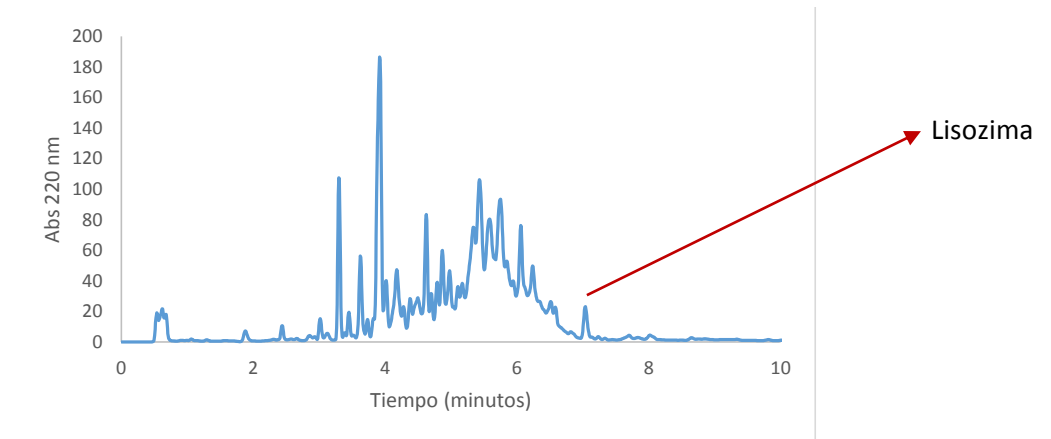
**Figura 26. Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina comercial hidrolizada a pH2,0 con pepsina.**

También en la figura 27 se observa que la lisozima de clara de huevo de gallina comercial no presenta el pico característico de la misma, por lo que no tiene diferencia entre los pHs 1,2 y 2,0; de la lisozima de clara de huevo de gallina comercial, en un tiempo de 7 minutos.



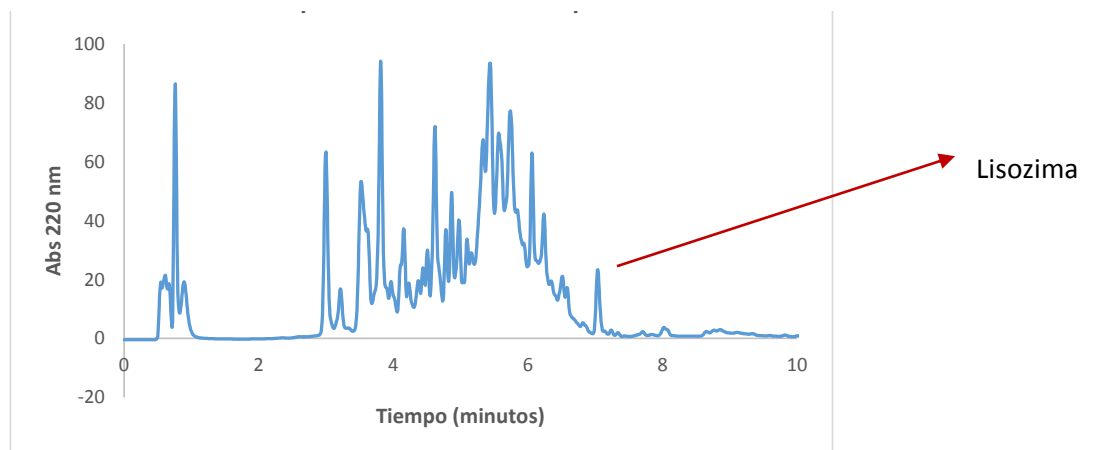
**Figura 27. Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina comercial hidrolizado a pH3,2 con pepsina.**

Así como también a la lisozima de clara de huevo de gallina purificada con NaCl fue sometida a hidrólisis y analizada mediante U-HPLC para detectar la presencia de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina. En la figura 28 se observa la hidrólisis de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada a pH 1,2 presento un pico característico de la lisozima en una pequeña proporción durante 7 minutos.



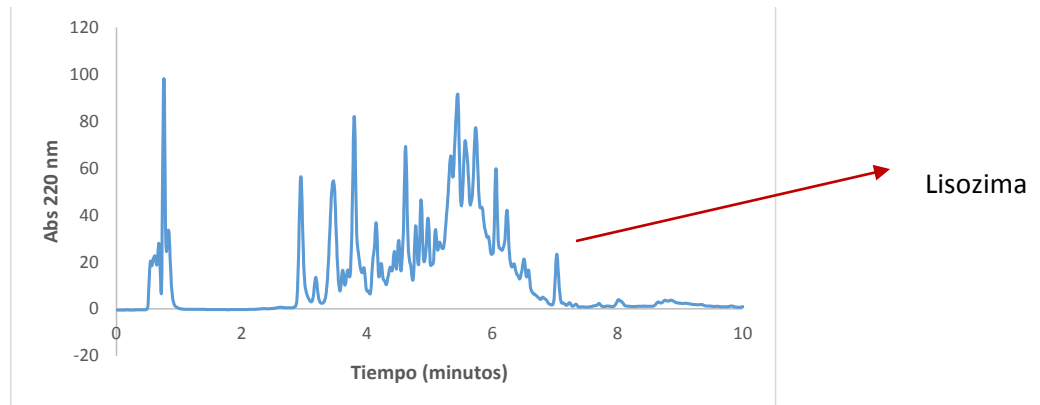
**Figura 28. Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada hidrolizado a pH 1,2 con pepsina.**

En la figura 29 se observó la lisozima de clara de huevo de gallina purificada fue hidrolizada a pH 2,0, también presento el pico característico de la lisozima de clara de huevo en mayor proporción en un tiempo de 7 minutos.



**Figura 29. Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada hidrolizado a pH 2,0 con pepsina.**

Por último, en la figura 30 se observa el pico característico de la lisozima de clara de huevo de gallina purificada luego de ser hidrolizada a pH 3,2 en el lapso de 7 minutos.



**Figura 30. Análisis en U-HPLC de lisozima de clara de huevo de gallina purificada hidrolizado a pH 3,2 con pepsina.**

#### **4.2. Verificación de la hipótesis**

1. Se acepta la hipótesis alternativa la cual establece que no se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante hidrolisis gástrica.
  
2. Se acepta la hipótesis nula la cual establece que si se modifica la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo mediante tratamiento térmico.

## 5. CAPÍTULO

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Se logró purificar la lisozima de clara de huevo de gallina mediante el uso de cromatografía rápida de proteínas (FPLC) y NaCl 1 M, dicha proteína presentó actividad enzimática respectivamente.
- La hidrólisis gástrica de la lisozima de clara de huevo de gallina demostró que a pH 1,2 la hidrólisis fue total y que a los pHs 2,0 y 3,2 fue parcialmente hidrolizada.
- Se demostró actividad enzimática en los hidrolizados gástricos de lisozima de clara de huevo de gallina comercial a pH 1,2 presentaron 23 %, a pH 2,0 un 47 % y a pH 3,2 un 42 % respectivamente. También en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada presentaron valores de actividad enzimática como 20 % a pH 1,2; 35 % a pH 2,0 y 48 % a pH 3,2 respectivamente.
- La lisozima de clara de huevo de gallina comercial y purificada sometida a calentamiento (microondas) presentaron actividades enzimáticas de 99 %; 92 %; 85 % y 73 % en los tratamientos 4,2,3,1 en la lisozima comercial respectivamente. También en la lisozima purificada sus actividades enzimáticas fueron de 99 %; 97 %; 96 %; y 95 % en los tratamientos 1,4,3,2.
- La lisozima comercial y purificada por cromatografía fueron capaces de inhibir la peroxidación lipídica en larvas de pez cebra fue del 21 % y 23 % así como también la lisozima hidrolizada presentó una alta actividad, siendo capaz de inhibir 82 % de la lisozima comercial y 84 % para la lisozima aislada.



## 5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar otro tipo de reactivo a parte del NaCl 1 M para la purificación de la proteína de lisozima de clara de huevo de gallina, como etanol.
- Debido a la sensibilidad de los análisis RP HPLC Y UHPLC en los análisis de lisozima de clara de huevo purificada es mejor usar el RP -HPLC.
- Se debe contar con suficientes envases herméticos para guardar la proteína purificada de lisozima de clara de huevo con esto evitamos contaminación y que absorba humedad.
- Se debería utilizar la tinción de nitrato de plata en caso de que no se observen claramente las bandas en la técnica de electroforesis (SDS-PAGE).
- En los análisis químicos y biológicos se debe usar el agua Mili Q para la obtención de mejores resultados, así como también en la limpieza de materiales.
- Debido al uso de reactivos tóxicos se debe utilizar la indumentaria adecuada para evitar posibles accidentes.
- Los peces debe ser alimentados dos veces por día controlando los siguientes parámetros como temperatura, pH y los filtros.

## Referencias bibliográficas

1. **Abdou A**, Higashiguchi S, Aboueleinin AM, Kim M & Ibrahim HR (2007) Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control*. 18: 173-178.
2. **Achouri A**, Boye JI. Thermal (2013) processing salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. *Food Research International*. 53: 240-251
3. **Alaiz M**, et al. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. (*Journal of Chromatography* 591:181-186).
4. **Anderson** María del Rosario, Vicente Calderón & Pascual (2000). *Microbiología Alimentaria-Metodología alimentaria para alimentos y bebidas*. Segunda edición. Editorial Diaz de Santos. Pág. 274
5. **Awade A** (1996) On hen egg fractionation: applications of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung and Forschung*, 202: 1-14.
6. **Badui S** (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, México Pág. 116-117
7. **Budd T**; Kuo C; Cazin J.; Yoo T (1983) Allergens of *Altenaria*: further characterization of a basic allergen fraction. *International Archives of Allergy Applications Immunology*, 71:83-87.
8. **Burks A** & Sampson H (1997). *Anaphylaxis and food allergy*. In: *Metcalfe, D.D., Sampson, H.A., Simon, R.A. (Eds.), Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. Blackwell Science, Cambridge 25–245
9. **Callewaert L** and Michellies C (2010). Lysozymes in the animal kindom. *Journal Bioscience*. 35: 127-160.

10. **Carrillo W**, García-Ruiz A, Recio I, & Moreno-Arribas M (2014) Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 77: 1732-1739. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-14-009.
11. **Carrillo W** (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química viva* 2:109-122
12. **Carrillo J**; Candia M; Lugo R; Espinoza E.; Noriega J (2013) Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS* 8: 19-26
13. **Carrillo W**, Tubón J, Vilcacundo R (2016). Isolation of hen egg white lysozyme by cation exchange chromatography, analysis of its digestibility and evaluation of the inhibition lipid peroxidation in the zebrafish model. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research* 9: 345-349.
14. **Carrillo W, Tubón J (2016)** Digestibility and enzymatic activity in vitro of hen egg white lysozyme. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research* 9: 376-378.
15. **Cegielska-Radziejewska R**, Lesnierowski G, Kijowski J. (2009) Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *European of Food Research Technology*. 228: 841-845.
16. **Cegielska-Radziejewska R**, Lesnierowski G, Tomasz Szablewski T, and Kijowski J (2010) Physico-chemical properties and antibacterial activity of modified egg white-lysozyme. *European of Food Research and Technology*. 231:959-964 DOI 10.1007/s00217-010-1347-y.
17. **Chiu H**, Lin C, and Suen S (2007) Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *Journal. Membrane Science*. 290: 259-266.
18. **Fu T**, Abbott U, Hatzos C (2002). Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated

intestinal fluid – a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7154–7160

19. **García H** & Vázquez R (1998). *Cuantificación de proteínas: una revisión*. Instituto de Biotecnología UNAM. México
20. **Garrido A** & Teijon J (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Segunda edición. Editorial TEBAR S.L. 115pp.
21. **Ibrahim H**, Inazaki D, Abdou A, Aoki T, Kim M (2005). Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: A novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1726: 102-114.
22. **Ibrahim H**, Matsuzaki T, Aoki T (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters*. 506: 27-32.
23. **Ibrahim H**, Higashiguchi S, Koketsu M, Juneja F, Kim M, Yamamoto T, Sugimoto Y and Aoki T (1996 b). Partially nfolded lysozymeatneutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 3799-3806.
24. **Ibrahim H**, Thomas U and Pellegrini A (2001 b) A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biology and Chemisrty*. 276: 43767-43774.
25. **Jiang C**, Wang M, Chang W and Chang H (2001) Isolation of Lysozyme Hen Egg Albumen by Alcohol-Insoluble Cross-Linked Pead Pod Solid Ion-Exchange Chromat. *Journal Food Science*, 66: 1089-1092.
26. **Jiménez-Saiz R**, Martos G, Carrillo W, López-Fandiño R, Molina E (2012). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Journal of Food Chemisrty*.127:1719-1726.
27. **Jolles P & Jolles J** (1984). What is new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63, 165–197.

28. **Kenna J** & Evans R. (2000) Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist*. 54:141
29. **King** 1978 Developments in Food Analysis Techniques. London, Applied Science Publishers.
30. **Laemmler U** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology*. 227: 680-685.
31. **Lee-Huang S**, Huang P, Sun Y, Huang P, Kung H, Blithe D and Chen H (1999). Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 2678-2681.
32. **Lesnierowski G**, Cegielska-Radziejewska R & Kijowski J (2004). Thermally and chemically modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World's Poultry Science Journal*. 60: 303-309.
33. **Lesnierowski G**, Borowiak R, Cegielska-Radziejewska R and Stangierski J (2013). Resorcinol as Protective Agent in Thermochemical Modification of Lysozyme. *Food Technology and Biotechnology*. 51:410–413.
34. **Lesnierowski G**, Kijowski J, and Cegielska-Radziejewska R (2009). Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 305–311.
35. **Lesnierowski G and Kijowski J** (2007). Lysozyme in Bioactive Compounds (edited by R. Huopalathi, R. López-Fandiño, M. Amton & R. Schade). Pp 33-42. Berlin Heidelberg: *Springer-Verlag*.
36. **Liu H**, Zheng F, Cao Q, Ren B, Zhu L, Striker G and Vlassara H (2006). Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *Am. Journal. Physiol. Endocrinol. Metabolic*. 290: E824.
37. **Losso J**, Nakai S, and Charter E (2000). Lysozyme. In: Naidu AS, ed. Natural Food Antimicrobial Systems. New York: CRC Press. 185-210.
38. **Lunow D**, Kaiser S, Brückner S, Gotsch A, Henle T (2013). Selective release of ACE-inhibiting tryptophan-containing dipeptides from food proteins by enzymatic hydrolysis. *European Journal of Food Research and Technology*. 237: 27-37.

39. **Martínez D**; Hernández B; Amigo L; Miralles B; Gómez J (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. *Proteomics in Foods: Principles and Applications, Food Microbiology and Food Safety* 2:21-50
40. **Martinez E** & Añón M (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal. Agricultural and Food Chemistry* 44:2523-2530.
41. **Martos G**, Contreras P, Molina E, and López-Fandiño R. (2010). Egg white ovoalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:5640–5648
42. **Mega T**, and Hase S (1994). Conversion of egg-white lysozyme to lectin like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinig. *Biophysic*. 64: 1488-1490.
43. **Memarpoor-Yazdi M**, Asoodeh A, Chamani T (2012) A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4: 278-286.
44. **Mine Y**, Ma F.P, and Lauriau S (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 58: 1088-1094
45. **Mine Y** and Yang M (2008) Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 56: 4874-4900.
46. **Nagel R**, DarT (2002) The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19:38-48
47. **Nielsen S** (2010). Food Analysis Laboratory Manual: Fish Muscle Proteins: Extraction, Quantitation, and Electrophoresis. *Food Science Texts Series*. 14: 115 -121
48. **Nielson S** (1988). Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteasas a review. *Cereal Chemistry*. 65: 435-442
49. **Oliveira M & Franca A**, (2002). Microwave heating of food stuffs. *Journal of food Engineering*. 53 :347- 359

50. **Orruño E**, Morgan M (2011) Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Journal of Food Chemistry* 128: 923-929).
51. **Osborne N**, Koplin J, Martin P, Gurrin L, Lowe A (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127: 668-676-662
52. **Pezzato L**, Miranda E, Barros M, Quintero L, Furuya W, Pezzato A (2002). Digestibilidad aparente de ingredientes pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31: 1595-1604.
53. **Pomeranz C. & Meloan**. (1971) *Food Analysis; Theory and Practice*. Westport, Connecticut, The AVI Publishing.
54. **Polverino de Laureto P**, Frare E, Gottardo R, Van Dael H, Fontana A. (2002). Partly folded status of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Science*. 11: 2932-2946
55. **Recio I** and Visser S (1999c). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_2$ -casein. *Biochemistry. Biophysical*. 1428: 314-326.
56. **Reyes E & Galván A** (2001). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de rabanales, Córdoba – España. Pp 1-7
57. **Rodríguez Sain-Jeant S**, De las Heras A, Carrillo W, Recio. I, Ortiz-Delgado. J, Ramos M, Saraquete C and Pérez-Prieto S (2012). Antiviral activity of casein and  $\alpha$ -S2 casein hydrolyzated against the infectious hematopoietic necrosis virus, A Rhabdovirus from Salmonid fish. *Journal Fish Diseases*.
58. **Peña A** (2004). "Bioquímica", 2da edición. Editorial Limusa S.A., México, pp. 47

59. **Sava G** (1996). Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. *EXS*. 75: 433-449.
60. **Sicherer S** (2011) Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 594-602
61. **Shugar D** (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultraviolet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*. 8: 302-309.
62. **Spitsbergen J**, Kent M (2003). The State of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research- advantages and current limitations. *Toxicol. Pathol.* 31:63-87
63. **Taylor S**, Lehrer S (1996). Principles and characteristics of food allergens. Critical review in *Food Science and Nutrition*, 36: S165-S186.
64. **Thomas K**, Aalbers M, Bannon G, Bartels M, Dearman R, Esdaile D, et al.,(2004) A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39: 87-98
65. **Westerfield M** (1995) The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd Edition. Eugene, OR, University of Oregon Press, 385.
66. **You S**; Udeniwe C; Aluko R and Wu J (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Journal of Food Research International*. 43: 848-855.



## ANEXOS

Figura 33. espectrofotometro DR500



Figura 34 digestión duodenal por dos horas.



Figura 35 digestión gástrica 37 °C por una hora.



Figura 36 sistema de electroforesis.



Figura 37 corrida de los geles de poliacrilamida.

Figura 38 cgel de lisozima aislada antes del teñido con azul de coomassie



Figura 39 gel de lisozima comercial antes del teñido con azul de coomasie.



Figura 40 muestras para actividad antioxidante.



Figura 41 solución de fosfatidilcolina oxidada y no oxidada para la actividad antioxidante.



Figura 42 muestras sometidas a 8 horas para la actividad antioxidante.



Figura 43 preparación de la muestra para ser medida la actividad antioxidante en el espectrofotómetro de los laboratorios de canje.



Figura 44 preparación de las muestras para la actividad antioxidante en el espectrofotómetro.



**Figura 45** lectura de las absorbancias de las muestras.



**Figura 46** equipo UHPLC



**Figura 47** sistema del UHPLC



**Figura 48** partes del UHPLC



**Figura 49 funcionamiento del UHPLC**



**Figura 50 jeringa para la succión de las muestras para el UHPLC.**



**Figura 51 sistema de filtración de agua Mili Q**



**Figura 52 membranas de filtración de agua.**



**Figura 53 muestra de lisozima comercial para ser calentada en el microondas.**



**Figura 54 muestra de lisozima aislada para ser calentada en el microondas.**



**Figura 57** pesado de la lisozima purificada.



**Tabla 3** Prueba de comparación múltiple test tukey en la concentración de proteína (mg/g) de lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial por el método BCA.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,44708

Error: 56,7703 gl: 2

Muestra	Medias	n	E.E.	
Comercial	108,64	3	4,35	A
Aislado	58,84	3	4,35	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 4** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de dos minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12259

Error: 0,0019 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
CONTROL	0,69	3	0,03	A
T4 (60-100%)	0,62	3	0,03	A B
T2 (30-100%)	0,56	3	0,03	B C
T3 (60-50%)	0,53	3	0,03	B C
T1 (30-50%)	0,45	3	0,03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 5** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de seis minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02980

Error: 0,0001 gl: 8

Tratamientos Medias n E.E.

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
CONTROL	0,49	3	0,01	A	
T2 (30-100%)	0,47	3	0,01	A	B
T3 (60-50%)	0,46	3	0,01		B
T4 (60-100%)	0,40	3	0,01		C
T1 (30-50%)	0,36	3	0,01		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 6** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a dos minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10150

Error: 0,0013 gl: 6

Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.		
Control	0,69	3	0,02	A	
pH 2.0	0,32	3	0,02		B
pH 3.2	0,29	3	0,02		B
pH 1.2	0,16	3	0,02		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 7** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina comercial sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a seis minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13996

Error: 0,0025 gl: 6

Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.		
Control	0,69	3	0,03	A	
pH 2.0	0,31	3	0,03		B
pH 3.2	0,28	3	0,03		B C
pH 1.2	0,15	3	0,03		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 8** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de dos minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03367

Error: 0,0001 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
CONTROL	0,69	3	0,01	A	
T1(30-50%)	0,68	3	0,01	A	B
T4(60-100%)	0,67	3	0,01	A	B
T3(60-50%)	0,66	3	0,01	A	B
T2(30-100%)	0,65	3	0,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 9** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a tratamiento térmico con microondas donde T4 60 segundos al 100 % de potencia, T2 30 segundos al 100 %, T3 60 segundos al 50 %, T1 30 segundos al 50 % en el lapso de seis minutos

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02851

Error: 0,0001 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
CONTROL	0,69	3	0,01	A	
T1(30-50%)	0,67	3	0,01	A	B
T4(60-100%)	0,66	3	0,01		B
T3(60-50%)	0,65	3	0,01		B
T2(30-100%)	0,64	3	0,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 11** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a dos minutos

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03195

Error: 0,0001 gl: 6

Muestras	Medias	n	E.E.		
Control	0,69	3	0,01	A	
pH 3.2	0,33	3	0,01		B
pH 2.0	0,24	3	0,01		C
pH 1.2	0,13	3	0,01		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 11.** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada sometida a hidrolisis gástrica a pHs 1,2;2,0 y 3,2 a seis minutos.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04222

Error: 0,0002 gl: 6

Muestras	Medias	n	E.E.	
Control	0,69	3	0,01	A
pH 3.2	0,33	3	0,01	B
pH 2.0	0,23	3	0,01	C
pH 1.2	0,13	3	0,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 12.** Prueba de comparación múltiple test tukey en la lisozima de clara de huevo de gallina purificada y comercial con respecto a su porcentaje de su actividad antioxidante.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,59984

Error: 26,5546 gl: 65

Muestra	Medias	n	E.E.	
Control	76,74	24	1,05	A
P. Comercial	70,90	12	1,49	B
P. Aislada	68,42	12	1,49	B
P. Com.calen	56,07	12	1,49	C
P. Aisl.calen	54,42	12	1,49	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## ISOLATION OF HEN EGG WHITE LYSOZYME BY CATION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY, ANALYSIS OF ITS DIGESTIBILITY AND EVALUATION OF THE INHIBITION LIPID PEROXIDATION IN THE ZEBRAFISH MODEL

CARRILLO W\*, TUBÓN J, VILCACUNDO R

Laboratory Functional Foods, Faculty of Foods Science and Engineering, Technical University of Ambato, Av. Los Chasquis y Río Payamino, Campus Huachi, CP 1801334, Ambato-Ecuador. Email: w.carrillo@uta.edu.ec

Received: 29 February 2016, Revised and Accepted: 10 March 2016

**ABSTRACT**

**Objective:** The aim of this study was to separate and identify lysozyme using cation exchange chromatography, evaluate the protein digestibility and analyze the inhibition lipid peroxidation in the zebrafish model.

**Methods:** Hen egg white lysozyme was isolate with cation exchange chromatography. Residual muramidase activity was evaluated with the spectrophotometric method. Isolate lysozyme (ILZ) and hydrolysates were analyzed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

**Results:** To identify the protein, the sample was isolated with cationic exchange chromatography, sample was analyzed using RP-HPLC and SDS-PAGE confirming that the fraction was hen lysozyme egg white. The enzymatic activity of the isolated protein was normal compared to the commercial lysozyme activity. Hydrolysates had no muramidase activity and were able to inhibit lipid peroxidation in zebrafish larvae.

**Conclusions:** Cation exchange chromatography is a good method to ILZ from egg white. Hydrolysates of lysozyme were effective to inhibit lipid peroxidation in zebrafish model.

**Keywords:** Lysozyme, Cation exchange chromatography, Enzymatic hydrolysis, Muramidase activity.

**INTRODUCTION**

Lysozyme [EC 3.2.1.7, N-acetyl-muramic-hydrolase] is a globular basic protein found in nature and is characterized by its high enzymatic activity. It was first discovered in nasal mucus by Alexander Fleming, who named it "Lysozyme" as he observed its lytic activity toward bacterial cocci [1]. The egg albumen is known to have an exceptionally high amount of lysozyme, normally referred to as hen's egg lysozyme, representing 3.5% of the egg white protein content [2-5]. The lysozyme is a basic protein consisting of 129 amino acids and a molecular weight of 14.3 kDa. This enzyme acts by lysing the cell walls of certain Gram-positive bacteria such as lactic acid bacteria and *Clostridium* sp. by splitting  $\beta$  (1-4) linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine of the peptidoglycan of bacterial cell walls [6-9]. Lysozyme has been associated with many biological activities such as antibacterial, antiviral, immunomodulating, immunostimulating, antioxidant, antiviral, and antitumoral activities among others [10-17]. Classical separation methods of proteins are based on the salting out of solution or precipitation with alcohol. These techniques have been extended by the ion exchange (IEX) chromatography and membrane separation in recent years. Presently, researchers are looking for separation methods, which will be cheap, easy, nontoxic, and maintaining the highest biological activity of isolated proteins [18-21]. The aim of the study was to isolate lysozyme (ILZ) using cation exchange chromatography, evaluate its digestibility and then measure their muramidase activity and ability to inhibit lipid peroxidation in zebrafish larvae.

**METHODS****Lysozyme and materials**

Lysozyme (L2879, chloride form from chicken egg white Grade VI, 40000 units/mg protein, EC 3.2.1.17) and pepsin crystalline (4500 units/mg obtained from porcine stomach mucus and *Micrococcus lysodeikticus*) were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA).

**Isolation of proteins from egg white**

About 500 ml of egg white treated with ethanol 30% and adjusted pH at 5.8 to separate the mucine. The solution was centrifuged at 4,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the precipitate was adjusted at pH 7.4 with 1 M NaOH and subject to IEX chromatography.

**IEX chromatography**

Proteins from egg white were separated by IEX as described by Recio and Visser [22] with some modifications using a fast protein liquid chromatography (FPLC) system with a cation exchange column HiLoadTM 26/10 SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) [23]. Solvent A was 10 mM ammonium hydrogen carbonate acidified to pH 7 with formic acid, and solvent B was 3 M ammonia solution. The effluent was monitored at 280 nm. Each chromatographic run was repeated 10 times, and the collected fractions were pooled, frozen, and lyophilized. Following these fractions were analyzed with reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

**Enzymatic hydrolysis of lysozyme**

Commercial, ILZ and hydrolysates were initially dissolved at 5 mg/ml in potassium phosphate buffer 10 mM (pH 1.5). 1 ml of this lysozyme solution was mixed with 50 ml of pepsin solution of 200 U/mg (5 mg/ml in solution of 0.035 M NaCl, pH 2.0) to obtain an enzyme-to-substrate ratio of 1:20 w/w. This mixture was incubated at 37°C for 1 hr. The reaction was stopped by heating at 80°C for 15 minutes, and the pH was adjusted at 7.0 by addition of 1 M NaOH [7].

**SDS-PAGE analysis**

The samples were dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 2.5% SDS, and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid [non-reducing conditions] or the same buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (reducing conditions), and heated at 95°C for 10 minutes [24]. Analysis by SDS-

PAGE used PhastSystem Electrophoresis apparatus, precast 20% homogeneous gels and PhastGel SDS Buffer Strips (GE Healthcare, Barcelona, Spain), following the electrophoretic and silver staining conditions of the manufacturer.

#### RP-HPLC analysis

Lysozyme hydrolysates, at a concentration of 2.0 mg/ml, were analyzed using a Hi-Pure® RP-318 (250 mm × 4.6 mm i.d.) column (Waters, Milford, MA) in a Waters 600 HPLC system. Solvent A was 0.37% (v/v) trifluoroacetic acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) in double-distilled water, and solvent B was 0.27% (v/v) trifluoroacetic acid in HPLC-grade acetonitrile (Lab-Scan, Gliwice, Poland). The chromatographic conditions were as in Martos et al. [25]. Detection was at 220 nm, and data were processed using Empower 2 Software (Waters).

#### Muramidase activity assay

The lytic activity of lysozyme was determined by monitoring the decrease in turbidity of a suspension of *M. lysodeikticus* cell spectrophotometrically at 450 nm at 25°C, according to Shugar's method [26]. One unit of lysozyme was defined as a decrease in the absorbance at 450 nm of 0.001 minutes<sup>-1</sup>. The muramidase activity of each sample was assayed in triplicate.

#### Thioarbituric acid reactive substances (TBARS)

The thioarbituric acid reactive species method was used as described by Westerfield, 1995 [27]. The zebrafish colony was established in the laboratory, in an environmental growth or glass aquarium, provided with internal filter and aerobic activated carbon for water oxygenation. The population of animals was fed three times a day with food chips for fish. Adult fish were kept on 16 hrs light and 10 hrs dark cycles. Embryos were obtained by photo-induced spawning over green plants and were cultured at 28°C in fish tank water. Larvae of 5 dpf were then incubated in 24-well plates, 30 larvae per well for each 100 mg/ml of lysozymes and hydrolysates. Lipid peroxidation was initiated by adding 1 ml 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated for 24 hrs at 28°C. Groups from 30 larvae/well in aquarium water were used as controls. Then, it was removed the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and it was added 500 µl of Tween 0.1%. Each group was mixed and homogenize with a T25 ultra turrax IKA after the absorbance was measured at 532 nm, and the decrease of absorbance indicates an increase of antioxidant activity. Values of antioxidant activity were expressed as the percentage inhibition of lipid peroxidation in larvae homogenate as follows: The total antioxidant activity % inhibition of lipid peroxidation = [(Ab-As)/Ab] × 100 where Ab = absorbance of control and As = absorbance of sample. The test larval was monitored using a microscope with a Motic Moticam 580, 5 MP.

#### Test of toxicity in the model of zebrafish

Zebrafish of the AB strain (wild-type, wt) embryos were obtained from natural spawnings. Embryos were raised and fish were maintained as described by Westerfield [27]. After collection and disinfection, eggs were reared in 24-well microplates with 1 ml of water.

#### Fish embryo toxicity (FET) test

The assay was based on the OECD draft guideline on FET test [28] and is described in detail by Domingues et al. [29]. 10 eggs per treatment (3 replicates) were selected and distributed in 24-well microplates. The test started with newly fertilized eggs exposed to the nominal concentrations of 0; 2.5; 5; 25; 50; 100 mg/ml of lysozymes and hydrolysates run for 2 days. Embryos were observed at 24 and 48 hrs under a stereomicroscope (magnification used for observations was ×40). The following parameters were evaluated as an endpoint and considered lethal if one of them is detected egg coagulation, lack of development somites, lack of tail detachment, and lack of heartbeat [30].

#### Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard deviation from three replicates of each experiment. Differences between mean values were

determined by the analysis of variance (ANOVA). The *post hoc* analysis was performed by the Tukey test. All tests were considered significant at p < 0.05. Statistical analysis was performed using the software package Prism 4 for Windows, version 4.3 (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

#### RESULTS

Hen egg white lysozyme is a protein with high isoelectric point (pI=10.7) in physiological conditions. At pH 7.0, lysozyme has positive charge but at pH >10.7 has negative charge. The egg white has different proteins such as ovalbumin (pI=4.5), ovotransferrin (pI=6.0), and ovomucin (pI=4.1); these proteins have an isoelectric point under 7.0; therefore, they have a net negative charge. These charge differences according to pI allow separating the white egg through cationic exchange chromatography [19]. This fact can be observed in Fig. 1. At the beginning of the chromatogram, a peak with high absorption can be observed at the wavelength used (220 nm), this peak relates to proteins with negative charge nature, as these proteins are unable to join to the negative charge of the column, resulting in being eluted with the solvent. While lysozyme was found retained in the column by charge affinity, the percentage of ammoniac concentration was increased to gradually increase pH, when pH overcome the pI of lysozyme, lysozyme changes the charge to become negatively charged and being eluted from the column, this fact is reflected at the second peak of the chromatogram with an absorption at the wavelength of 220 nm. To determine if lysozyme was effectively separated, the collected FPLC fraction was subject to RP-HPLC with the aim of confirming with its time retained compared to the time retained of a standard of commercial lysozyme (CLZ), to confirm whether or not effectively is lysozyme.

Fig. 2a shows 38 minutes retained time for a standard lysozyme at the concentration of 2 mg/ml; it was then observed the same retained time for the fraction obtained through fast protein liquid chromatography (FPLC) (Fig. 2b). Both CLZ and the fraction of FPLC were subject to hydrolysis with pepsin at pH 1.2; and it was observed the same behavior for both of them. Pepsin hydrolyzes protein completely at this pH. The products of the hydrolysis are identical in the CLZ and the isolated lysozyme (Fig. 2c and d).

The fraction obtained through FPLC was analyzed by SDS-PAGE. In Fig. 3, it is shown that lane 2 reflects the CLZ, lane 3 to the purified FPLC lysozyme, both bands being at the same height of retain in the gel.

Using data of lane 1, which corresponds to the molecular weight marker, we can see that both bands are at 14,400 Da. Confirming the molecular weight of the purified protein in the FPLC obtained fraction. In lanes number 4 and 5, two bands below 14,400 Da can be observed;

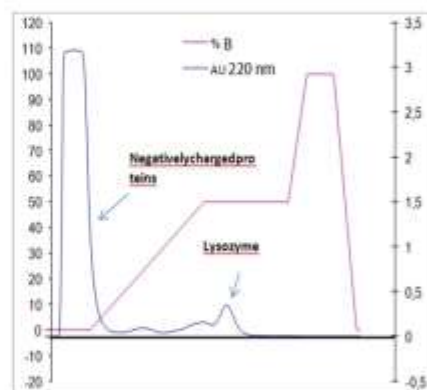


Fig. 1: Separation of lysozyme of egg white by cation exchange chromatography using ammonia 3 M

those lanes relate to peptides resulting of the product of the hydrolysis with pepsin. No intact lysozyme can be observed at this hydrolysis pH.

We finally evaluate the enzymatic activity of the lysozyme of white egg or also called muramidase activity. White egg lysozyme has the capacity of hydrolyzing the walls of bacteria Gram-positive. For this test, lyophilized walls of *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 were used, the decrease of absorbance at 450 nm was measured. In Fig. 4, it can be seen that the FPLC purified lysozyme presented 97% of muramidase activity, the CLZ hydrolyzed only kept 1.7% of said activity and the FPLC purified lysozyme hydrolyzed presented only kept 2.0% of said enzymatic activity, this data indicate that the active site of lysozyme was reduced to small fragments, which have no muramidase activity.

These results are in agreement with different studies where has been described hydrolyzed lysozyme with no muramidase activity [4,31].

In Fig. 5a, it can be seen that CLZ and the isolated lysozyme through chromatography were only able to inhibit the lipid peroxidation in zebrafish larvae 21% and 23%, respectively, whereas hydrolyzed presented a high activity, being able to inhibit 82% for the hydrolyzed of CLZ and 84% for the isolated hydrolyzed lysozyme through cationic exchange chromatography. Both hydrolyzed were effective, and there

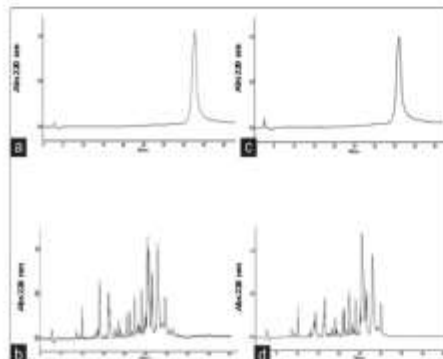


Fig. 2: Reversed-phase high-performance liquid chromatography of lysozyme. (a) commercial lysozyme (CLZ), (b) isolate lysozyme (ILZ), (c) hydrolysate of CLZ, (d) hydrolysate of ILZ

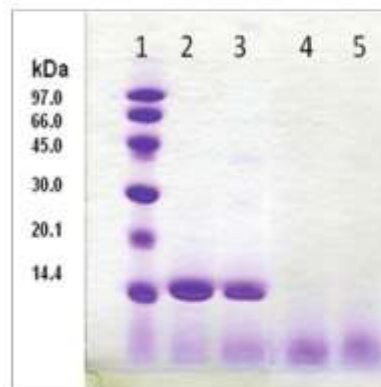


Fig. 3: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of lysozyme. Lane 1: Weight molecular, Lane 2: Commercial lysozyme (CLZ), Lane 3: Isolate lysozyme (ILZ), Lane 4: Hydrolysate of CLZ, Lane 5: Hydrolysate of ILZ. Coomassie-stained polyacrylamide gel

are not meaningful differences when they are analyzed statistically. The zebrafish larvae after 24 hrs of the assay when were examined no show obvious morphological abnormalities as crooked bodies, spinal deformities, and not exhibit any significant effects on the growth of the body zebrafish larvae (Fig. 5b).

As shown in Fig. 6a, the mortality of the Zebrafish egg when they were treated with different concentrations of lysozymes and hydrolysates. No significant effect on the survival rate was observed for all treatments groups. When the morphologies of these lysozymes treated were examined, no show obvious morphological abnormalities such as egg coagulation, lack of development somites, lack of tail detachment, and lack of heartbeat. The embryos were normal (Fig. 6b).

## DISCUSSION

Egg is one of the most common foods that induce hypersensitive reactions in young children. Egg white contains more than 20 kinds of proteins. Ovomucoid (Gal d 1), ovalbumin (Gal d 2), ovomaferrin (Gal d 3), and lysozyme (Gal d 4) have been identified as main allergens in the egg white. Hen egg white lysozyme is a potent allergen named Gal d4 with resistant at hydrolysis with pepsin. It is known that lysozyme

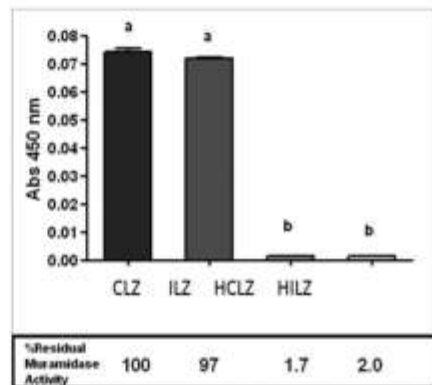


Fig. 4: Residual muramidase activity of commercial lysozyme (CLZ), isolate lysozyme (ILZ), hydrolysate of CLZ and hydrolysate of ILZ. The decrease in turbidity of a cell suspension of *Micrococcus lysodeikticus* was determined at 450 nm in phosphate buffer at pH 6.24 and 25°C. Data were analyzed by analysis of variance (GraphPad Prism), and the means were separated by Tukey's multiple range test. The significance was defined at  $p \leq 0.05$

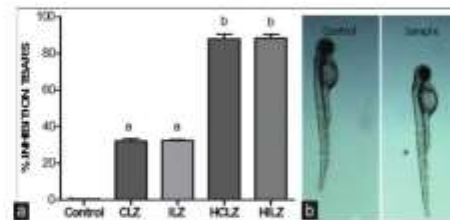


Fig. 5: (a) Thiobarbituric acid reactive results of lysozyme. Data are expressed as % thiobarbituric acid reactive substances inhibition compared to a negative control (error bars expressed as  $\pm$ SD).  $n=30$  zebrafish larvae. Commercial lysozyme (CLZ), isolate lysozyme (ILZ), hydrolysate of CLZ and hydrolysate of ILZ. (b) Morphologies of zebrafish larvae after incubation with lysozymes

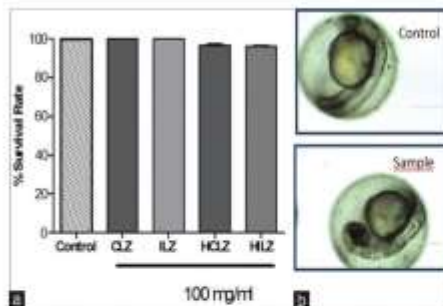


Fig. 6: (a) Survival rate of zebrafish embryos exposed with various concentrations of lysozymes for 48 hrs, (b) photography of zebrafish egg after 48 hrs incubation with lysozymes

has resistance to the hydrolysis with pepsin, but it has been recently described that lysozyme at pH 1.2 has total susceptibility to the hydrolysis with pepsin [7,32-34]. In this study, hen egg white lysozyme was hydrolyzed with pepsin at low pH in simulated gastric fluid (SGF).

The relationship between allergenicity and stability to digestion and the most appropriate experimental conditions for measurement of stability have been the subject of some discussion. The first report by Astwood et al. [31] demonstrated that many animals and plant food allergens displayed resistance to pepsin digestion *in vitro*, whereas other common plant proteins believed not to be allergenic were digested rapidly (within 30 seconds). The hydrolysis *in vitro* with pepsin was assayed in SGF 0.35 M NaCl. However, in subsequent studies, the relationship between resistance to digestion and allergenicity was found not to be absolute [35-37].

#### CONCLUSIONS

Isolate protein by cation exchange chromatography was analyzed with RP-HPLC; SDS-PAGE and identified as hen egg white lysozyme. Its slytic enzymatic was normal compared to CLZ. Isolated lysozyme was susceptible to *in vitro* digestion with pepsin at pH 1.5. Hydrolyzed of both commercial and isolated lysozymes were able to inhibit lipid peroxidation in zebrafish larvae.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. This work has been reviewed in the English edition by Emilio Labrador. This work was support for project form Universidad Técnica de Ambato.

#### REFERENCES

- Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* 1984;63(2):165-89.
- You SJ, Udenigwe CC, Ahiko RE, Wu J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Res Int* 2010;43(3):848-55.
- Memarpour-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani T. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J Funct Foods* 2012;4:278-86.
- Mine Y, Ma F, Laurian S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem* 2004;52(5):1088-94.
- Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agric Food Chem* 2008;56(13):4874-900.
- Calleraert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* 2010;35(1):127-60.
- Carrillo W, Garcia-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas MV. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *J Food Prot* 2014;77(10):1732-9.

- Cegielska-Radziejewska R, Lesniewski G, Kijowski J. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur Food Res Technol* 2009;228(5):841-5.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesniewski G, Szablewski T, Kijowski J. Physico-chemical properties and antibacterial activity of modified egg white-lysozyme. *Eur Food Res Technol* 2010;23(6):959-64.
- Jiménez-Suiz R, Martos G, Carrillo W, López-Fandiño R, Molina E. Susceptibility of lysozyme to *in-vitro* digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chem* 2011;127:1719-26.
- Linow D, Kaiser S, Brückner S, Gotsch A, Henle T. Selective release of ACE-inhibiting tryptophan-containing dipeptides from food proteins by enzymatic hydrolysis. *Eur Food Res Technol* 2013;237:27-37.
- Abdou AM, Higashiguchi S, Abouleinin AM, Kim M, Ibrahim HR. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control* 2007;18:173-8.
- Ibrahim HR, Higashiguchi S, Koketsu M, Junzo F, Kim M, Yamamoto T, et al. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J Agric Food Chem* 1996;44(12):5799-806.
- Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett* 2001;506:27-32.
- Ibrahim HR, Inazaki D, Abdou A, Aoki T, Kim M. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: A novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochim Biophys Acta* 2005;1726(1):102-14.
- Lesniewski G, Bonowak R, Cegielska-Radziejewska R, Stangierski J. Resorcinol as protective agent in thermochemical modification of lysozyme. *Food Technol Biotechnol* 2013;51(3):410-3.
- Lesniewski G, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J. Thermally and chemically modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *Worlds Poult Sci J* 2004;60:303-9.
- Awade AC. On hen egg fractionation: Applications of liquid chromatography in the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1996;202:1-14.
- Chiu HC, Lin CW, Suen SY. Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *J Membr Sci* 2007;290(1):259-66.
- Lesniewski G, Kijowski J. Lysozyme. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2007. p. 33-42.
- Lesniewski G, Kijowski J, Cegielska-Radziejewska R. Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *Int J Food Sci Tech* 2009;44:305-11.
- Recio I, Visser S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_2$ -casein. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428(2-3):314-26.
- Rodríguez-Sant-Juan S, De las Heras A, Carrillo W, Recio I, Ortiz-Delgado JB, Ramos M, et al. Antiviral activity of casein and  $\alpha_2$  casein hydrolysates against the infectious haematopoietic necrosis virus, a rhabdovirus from salmonid fish. *J Fish Dis* 2013;36(5):467-81.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- Martos G, Cuemeras P, Molina E, López-Fandiño R. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2010;58(9):5640-8.
- Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 1952;8(3):302-9.
- Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 3rd ed. Eugene, OR: University of Oregon Press; 1995. p. 385.
- OECD. Test N. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris: OECD Publishing.
- Domingues I, Oliveira R, Lourenço J, Grisiola CK, Mendo S, Soares AM. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010;152(3):338-45.
- Nagel R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - A general model in ecotoxicology and toxicology. *Alex* 2002;19 Suppl 1:38-48.
- Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nat Biotechnol* 1996;14(10):1269-73.
- Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J Biol Chem* 2001;276(47):43767-74.
- Thomas K, Aalbers M, Barron GA, Bartels M, Dearman RJ.

- Esdailk DI, et al. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39(2):87-98.
34. Polverino de Lauro P, Friare E, Gottardo R, Van Duyl H, Fontana A. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Sci* 2002;11(12):2932-46.
35. Lucas JS, Cochrane SA, Warner JO, Hourihane JO. The effect of digestion and pH on the allergenicity of kiwifruit proteins. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19(5):392-8.
36. Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50(24):7154-60.
37. Foster ES, Kimber I, Dearman RJ. Relationship between protein digestibility and allergenicity: Comparisons of pepsin and cathepsin. *Toxicology* 2013;309:30-8.

DIGESTIBILITY AND ENZYMATIC ACTIVITY *IN VITRO* OF HEN EGG WHITE LYSOZYME

CARRILLO W\*, TUBÓN J

Laboratory of Functional Foods, Faculty of Foods Science and Engineering, Technical University of Ambato,  
Av. Los Chasquis y Rio Payamino, Campus Huachi, CP 1801334, Ambato, Ecuador. Email: w.carrillo@uta.edu.ec

Received: 10 March 2016, Revised and Accepted: 19 March 2016

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the protein digestibility and analyze the residual enzymatic activity of lysozyme.**Methods:** Protein digestibility was evaluated hydrolyzing the protein with pepsin at pH 1.2, 2.0, and 3.2 during 60, 90, and 120 minutes of incubation. These hydrolysates were analyzed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. Residual enzymatic activity was evaluated with the spectrophotometric method at 450 nm.**Results:** Lysozyme was totally hydrolyzed with pepsin at pH 1.2. At pH 2.0, lysozyme was partially hydrolyzed and at pH 3.2 hydrolysis was absent at all times of the assay.**Conclusions:** Lysozyme was hydrolyzed with pepsin at low pH. Residual enzymatic method can be used to determine the grade of hydrolysis in lysozyme.**Keywords:** Lysozyme, Enzymatic hydrolysis, Muramidase activity, Antimicrobial activity.

## INTRODUCTION

Lysozyme (E.C.3.2.1.17, N-acetyl-muramic-hydrolase) is a globular basic protein found in nature and is characterized by its high enzymatic activity. It was first discovered in nasal mucus by Alexander Fleming, who named it "lysozyme" as he observed it is lytic activity toward bacterial cocci [1]. The egg albumen is known to have an exceptionally high amount of lysozyme, normally referred to as hen's egg lysozyme, representing 3.5% of the egg white protein content [2-4]. The lysozyme is a basic protein consisting of 129 amino acids and a molecular weight of 14.3 kDa. This enzyme acts by lysing the cell walls of certain Gram-positive bacteria such as lactic acid bacteria and *Clostridium* sp. by splitting  $\beta$  (1-4) linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine of the peptidoglycan of bacterial cell walls. This enzymatic activity is named muramidase activity or lytic activity [5-8]. The eight foods traditionally considered to be responsible for more than 90% of food allergy are milk products, eggs, fish, shellfish, peanuts, tree nuts, wheat, and soy [9]. Among food allergies, allergy to egg is, together with peanut and milk, the most common in children and infants with a prevalence that varies between 7.9% and 10% [10,11]. It is generally believed that protein, which is resistant to proteolytic digestion in the digestive tract, retains sufficient structural integrity to have an increased probability of stimulating immune reactions. Small amounts of intact partially digested proteins are absorbed in the intestine and enter the circulatory system. Simulate gastric fluid (SGF) is used to determine the digestibility and allergenicity of a protein [12]. In this study, the digestibility of hen egg white lysozyme was investigated and characterized using pepsin enzyme. Protein digestion was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method, and residual enzymatic activity was analyzed with the spectrophotometric method.

## METHODS

## Lysozyme and materials

Lysozyme (L2879, chloride from chicken egg white Grade VI, 40,000 units/mg protein, EC.3.2.1.17) and pepsin crystalline (4500 units/mg obtained from porcine stomach mucus and *Micrococcus lysodeikticus*) were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA).

## Enzymatic hydrolysis of lysozyme

Commercial, isolate lysozyme and hydrolysates were initially dissolved at 5 mg/mL in potassium phosphate buffer 10 mM (pH 1.5). 1 ml of this lysozyme solution was mixed with 50  $\mu$ L of pepsin solution of 200 U/mg, 5 mg/mL in solution of 0.035 M NaCl SGF at pH 1.2, 2.0, and 3.2 to obtain an enzyme-to-substrate ratio of 1:20 w/w. This mixture was incubated at 37°C during 1 hr. The reaction was stopped by heating at 80°C for 15 minutes, and the pH was adjusted at 7.0 by addition of 1 M NaOH [7].

## SDS-PAGE analysis

Samples were dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 2.5% SDS, and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (non-reducing conditions) or the same buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (reducing conditions), and heated at 95°C for 10 minutes [13]. Analysis by SDS-PAGE used Mini-Protein Tetra Cell (Bio-Rad, USA) electrophoresis apparatus at 200 V. The electrophoretic and silver staining conditions were carried out according to the manufacturer instructions.

## Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis

Lysozyme hydrolysates, at a concentration of 2.0 mg/mL, were analyzed using a Hi-Pure<sup>®</sup> RP-318 (250  $\times$  4.6 mm i.d.) column (Waters, Milford, MA) in a Waters 600 HPLC system. Solvent A was 0.37% (v/v) trifluoroacetic acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) in double-distilled water, and solvent B was 0.27% (v/v) trifluoroacetic acid in HPLC-grade acetonitrile (Lab-Scan, Gliwice, Poland). The chromatographic conditions were as in Martos *et al.* [14]. Detection was at 220 nm, and data were processed using Empower 2 Software (Waters).

## Muramidase activity assay

The lytic activity of lysozyme was determined by monitoring the decrease in turbidity of a suspension of *M. lysodeikticus* cell spectrophotometrically at 450 nm at 25°C, according to Shugar's method [15]. One unit of lysozyme was defined as a decrease in the absorbance at 450 nm of 0.001/minutes. The muramidase activity of each sample was assayed by triplicate.

### Statistical analysis

Results are presented as mean±standard deviation from three replicates of each experiment. Differences between mean values were determined by the analysis of variance. The *post-hoc* analysis was performed by the Tukey test. All tests were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the software package Prism 4 for Windows, version 4.3 (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

### RESULTS

#### Gastric hydrolysis

Hen egg white lysozyme was hydrolyzed with pepsin at different pHs in SGF (NaCl 0.35 M) with a relation enzyme/substrate of 1/20 during 60, 90, and 120 minutes at 37°C, 400 rpm. SDS-PAGE electrophoresis analysis shows that lysozyme was totally hydrolyzed with pepsin at a low pH 1.2 at all times assays. The 14,400 Da band was not found at pH 1.2, the band with molecular weight of 6,500 Da was found corresponding to peptides produced of hydrolysis with pepsin, at this pH 1.2 (Fig. 1)

At pH 2.0, the lysozyme was partially hydrolyzed. The band with molecular weight of 14,400 Da was found, this band corresponds to lysozyme. At this same pH 2.0, the hydrolysis was more effective at a time of 120 minutes of incubation with pepsin, compared to the bands using the 60 and 90 minutes incubation. (Fig. 1)

At pH 2.0, the molecular weight bands of 6,500 Da were found, corresponding to peptides produced with hydrolysis with pepsin. On the other hand, lysozyme was not hydrolyzed with pepsin at pH 3.2, at all times assay. Lysozyme has resistance at gastric hydrolysis with pepsin at pH 2.0 and pH 3.2 in these conditions of the assay.

#### RP-HPLC

RP-HPLC analysis of hydrolysates of lysozyme during 60 minutes shows that lysozyme was totally hydrolyzed at pH 1.2. At pH 2.0, hydrolysis was partially obtained. Finally, at pH 3.2 hydrolysis was not present (Fig. 2). These results were similar in all times assay (Fig. 1)



Fig. 1: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of lysozyme hydrolyzed. Lane 1: Molecular weight, Lane 2: Lysozyme without pepsin, Lane 3: Lysozyme with pepsin at pH 1.2 (60 minutes), Lane 4: Lysozyme with pepsin at pH 1.2 (90 minutes), Lane 5: Lysozyme with pepsin at pH 1.2 (120 minutes), Lane 6: Lysozyme with pepsin at pH 2.0 (60 minutes), Lane 7: Lysozyme with pepsin at pH 2.0 (90 minutes), Lane 8: Lysozyme with pepsin at pH 2.0 (120 minutes), Lane 9: Lysozyme with pepsin at pH 3.2 (60 minutes), Lane 10: Lysozyme with pepsin at pH 3.2 (90 minutes), Lane 11: Lysozyme with pepsin at pH 3.2 (120 minutes) and Lane 12: Pepsin blank

### Enzymatic activity

Enzymatic activity was tested to determine the degree of gastric hydrolysis at pH 1.2, 2.0, and 3.2. Lysozyme enzyme needs its active site to bind to the substrate. The site can be modified through hydrolysis with pepsin. The residual activity was evaluated with the spectrophotometric method at 450 nm with a solution of *M. lysodeikticus* ATCC 4698. Fig. 3 shows the enzymatic activity of lysozymes. Native lysozyme was used as positive control. Fig. 3a shows the residual enzymatic activity of hydrolyzed lysozyme during 60 minutes with pepsin at pH 1.2. We can see that hydrolyzed lysozyme has no enzymatic activity, and it only conserves 1.0% of its natural activity. At pH 2.0, during 60 minutes, hydrolyzed lysozyme conserved 45% of its enzymatic activity. At pH 3.2, hydrolyzed lysozyme conserved 98% of its enzymatic activity compared to control lysozyme. The 90 minutes hydrolysates present residual enzymatic activity with values of 0.8%, 38%, and 90% at pH 1.2, pH 2.0, and pH 3.2, respectively (Fig. 3b).

Hydrolysates lysozyme during 120 minutes present residual enzymatic activity with values of 0.6%, 35%, and 87% at pH 1.2, 2.0, and 3.2, respectively (Fig. 3c). These results show that the enzymatic activity was proportional to the time of hydrolysis with pepsin.

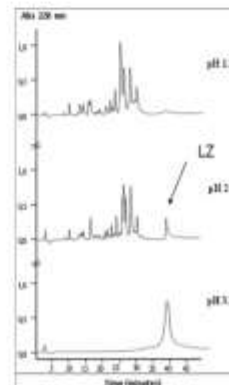


Fig. 2: Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of hydrolysates of lysozyme during 60 minutes

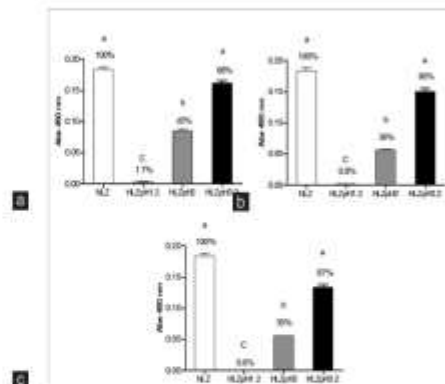


Fig. 3: Residual enzymatic activity of lysozyme, (a) Hydrolysates of lysozyme with pepsin at pH 1.2, 2.0, and 3.2 during 60 minutes, (b) hydrolysates of lysozyme with pepsin at pH 1.2, 2.0, and 3.2 during 90 minutes, (c) hydrolysates of lysozyme with pepsin at pH 1.2, 2.0, and 3.2 during 120 minutes

### DISCUSSION

Hen egg white lysozyme is a potent allergen named Gal d4 with resistance to hydrolysis with pepsin. In this study, lysozyme was totally hydrolyzed with pepsin at low pHs. However, it has been recently described that lysozyme at pH 1.2 has a total susceptibility to the hydrolysis with pepsin [16-18]. Fu et al. [19] have reported that lysozyme resisted more than 60 minutes at pH 1.2, at an E.S of (13:1) wt:wt. Thomas et al. described that hen egg white lysozyme is resistant to hydrolysis with pepsin at pH 2.0. Ibrahim et al. [20] found that 40% of the original lysozyme was hydrolyzed after 120 minutes of digestion at an E.S of 1:50 (wt:wt) at pH 4.0. Lysozyme is also a major allergen of egg white. It is generally accepted that resistance to digestion is a common feature to food allergens. There is controversy about the hydrolysis of hen egg white lysozyme, but this might be due to the different methods used.

On the other hand, we have reported hydrolysates of lysozyme without muramidase activity. These results are in agreement with different studies where hydrolyzed lysozyme with no muramidase activity has been described. Mine et al., 2004 [4] have described hydrolyzed of lysozyme with antimicrobial activity without muramidase activity. On the other hand, You et al., 2010 [2] described hydrolyzed and peptides from lysozyme without muramidase activity. Other authors such as Ibrahim et al., 2005 [20] have also described hydrolyzed of lysozyme with antibacterial activity but without muramidase activity.

### CONCLUSIONS

Hen egg white lysozyme was hydrolyzed with pepsin at low pHs. Hydrolysates of lysozyme at pH 1.2 do not present enzymatic activity. Hydrolysates at pH 3.2 conserve their enzymatic activity as in native lysozyme. The residual enzymatic activity method can be used to determine the degree of hydrolysis of the enzyme.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work has been reviewed in the English edition by Emilio Labrador.

### REFERENCES

- Jollés P, Jollés J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* 1984;63(2):165-89.
- You SJ, Udenigwe CC, Ahiko RE, Wu J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Res Int* 2010;43:848-55.
- Memarpour-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani T. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J Funct Foods* 2012;4:278-86.
- Mine Y, Ma F, Lauriau S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem* 2004;52(5):1088-94.
- Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *J Agric Food Chem* 2008;56(13):4874-900.
- Callewaert L, Michellies C. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* 2010;35:127-60.
- Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas MV. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *J Food Prot* 2014;77:1732-9.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur Food Res Technol* 2009;228:841-5.
- Achouri A, Boye JI. Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. *Food Res Int* 2013;53:240-51.
- Obbome NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):668-76.e1-2.
- Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):594-602.
- Orruño E, Morgan MR. Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Food Chem* 2011;128:923-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- Marsos G, Contreras P, Molina E, López-Fandiño R. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2010;58(9):5640-8.
- Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 1952;3(3):302-9.
- Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett* 2001;506(1):27-32.
- Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, et al. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39(2):87-98.
- Polveroso de Laurentis P, Frare F, Gottardo R, Van Duyl H, Fontana A. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Sci* 2002;11(12):2932-46.
- Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C. Digestibility of food allergens and non-allergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50(24):7154-60.
- Ibrahim HR, Inazaki D, Abdou A, Aoki T, Kim M. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: A novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochim Biophys Acta* 2005;1726(1):102-14.