



Universidad de Valladolid

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA



PROYECTO DE FIN DE MÁSTER

**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE
EXTRACTOS DE SOJA ENRIQUECIDOS EN EL PÉPTIDO LUNASINA**

Presentado por:
GISELLE FRANCA OLIVEIRA

Tutor:
Dra. BLANCA HERNÁNDEZ LEDESMA
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
(CIAL, UAM-CSIC)

Co-tutor:
Dra. IRENE CÓZAR CASTELLANO
Instituto de Biología y Genética Molecular
(IBGM, UVa-CSIC)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAPH. 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)
ABTS. 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ANOVA. Análisis de Varianza
AP. Aislado de Proteína de Soja TW900 emulsión. Aislado de Proteína de Soja
AUC. Area Under the Curve. Área Bajo la Curva
BAT. Unidad de Técnicas Bioanalíticas
BBI. Bowman-Birk Inhibitor. Inhibidor de Bowman-Birk
BCA. Bicinchoninic Acid. Ácido Bicinconínico
BSA. Bovine Serum Albumin. Seroalbúmina Bovina
CBMSO. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CIAL. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
CP. Concentrado Proteico de Soja HC 200. Concentrado de Proteína de Soja
DE. Desviación Estándar
DMEM. Dulbecco's Modified Eagle's Media. Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMEM Completo. Dulbecco's Modified Eagle's Media, 5% Penicilin, Streptomycin, Amphotericin, 10% Fetal Bovine Serum. Medio Eagle Modificado de Dulbecco, 5% Penicilina, Estreptomycina y Anfotericina, 10% Suero Fetal Bovino.
EAP E1. Extracto del Aislado de Proteína de Soja 1
EAP E2. Extracto del Aislado de Proteína de Soja 2
EAP UF1. Fracción >10 kDa del Extracto del Aislado de Proteína de Soja
EAP UF2. Fracción entre 3 y 10 kDa del Extracto del Aislado de Proteína de Soja
EAP UF3. Fracción <3 kDa del Extracto del Aislado de Proteína de Soja
ECP UF1. Fracción >10 kDa del Extracto del Concentrado de Proteína de Soja
ECP UF2. Fracción entre 3 y 10 kDa del Extracto del Concentrado de Proteína de Soja
ECP UF3. Fracción <3 kDa del Extracto del Concentrado de Proteína de Soja
ECP. Extracto del Concentrado de Proteína de Soja
ET. Equivalente de Trolox
ETP E1. Extracto del Texturizado de Proteína de Soja 1
ETP E2. Extracto del Texturizado de Proteína de Soja 2
ETP UF1. Fracción >10 kDa del Extracto del Texturizado de Proteína de Soja
ETP UF2. Fracción entre 3 y 10 kDa del Extracto del Texturizado de Proteína de Soja
ETP UF3. Fracción <3 kDa del Extracto del Texturizado de Proteína de Soja
FBS. Fetal Bovine Serum. Suero Fetal Bovino
Gm2S-1. *Glycine max* 2S-1
KTI. Kunitz Trypsin Inhibitor. Inhibidor de tripsina Kunitz
LC-MS/MS. Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem
LPS. Lipopolisacárido Bacteriano
NF- κ B. Factor Nuclear kappa B
NO. Nitric Oxide. Óxido Nítrico
ORAC. Oxygen Radical Antioxidant Capacity. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
PBS. Phosphate Buffered Saline. Tampón Fosfato Salino
PSA. Penicilin, Streptomycin y Amphotericin. Penicilina, Estreptomycina y Anfotericina
PVDF. Polyvinylidene Fluoride. Fluoruro de Polivinilideno
Rf. Relative front. Movilidad Electroforética Relativa
SDS. Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Electroforesis en Gel de Poliacrilaminada con Dodecilsulfato sódico
TBST 1%. Tris Buffered Saline 1x con 1% de Tween 20. Tris Salino Tamponado 1x con 1% de Tween 20
TBST-LD 3%. Tris Buffered Saline 1x 1% de Tween 20, leche desnatada 3%. Tris Salino

Tamponado 1x con 1% de Tween 20 y leche desnatada 3%
TBST-LD 5%. Tris Buffered Saline 1x 1% de Tween 20, leche desnatada 5%. Tris Salino
Tamponado 1x con 1% de Tween 20 y leche desnatada 5%
TEAC. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Capacidad Antioxidante de Equivalentes de Trolox
TP. Texturizado Proteico de Soja (SOPROTEX-N). Texturizado de Proteína de Soja
Trolox. 6-hidroxi-2,5,7,8-ácido de tetrametilcroman-2-carboxílico
TTS. Tris/Tricine/Sodium Dodecyl Sulfato. Tris/Tricina/Dodecilsulfato sódico
UF1. Fracción >10KDa
UF2. Fracción entre 3 y 10 kDa
UF3. Fracción <3KDa
USB. United Soybean Board. Consejo Unido de la Soja
USDA. United States Department of Agriculture. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
WB. Western Blot

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Soja	2
1.2. Proteínas y péptidos de la soja	3
1.3. Lunasina	4
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Lunasina sintética y muestras comerciales de soja	8
3.2. Obtención y fraccionamiento de extractos procedentes de los productos comerciales	9
3.2.1. <i>Extracción con solvente acuoso</i>	9
3.2.2. <i>Fraccionamiento de los extractos mediante ultrafiltración</i>	9
3.3. Caracterización de los extractos y las fracciones	9
3.3.1. <i>Determinación del contenido proteico</i>	9
3.3.2. <i>Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	10
3.3.3. <i>Análisis proteómico</i>	10
3.4. Identificación y cuantificación del péptido lunasina	10
3.5. Evaluación de la actividad biológica de los extractos y las fracciones	11
3.5.1. <i>Actividad antioxidante (ensayo ORAC)</i>	11
3.5.2. <i>Actividad antioxidante (ensayo ABTS)</i>	11
3.5.3. <i>Modelos celulares</i>	12
3.5.3.1. <i>Determinación de óxido nítrico (ensayo de Griess)</i>	12
3.6. Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Caracterización de los extractos y las fracciones	13
4.2. Identificación y cuantificación del péptido lunasina	15
4.3. Actividad biológica de los extractos y las fracciones	17
4.3.1. <i>Actividad antioxidante mediante los ensayos ORAC y ABTS</i>	17
4.3.2. <i>Actividad inmunomoduladora en un modelo celular</i>	18
4.3.2.1. <i>Determinación de óxido nítrico (ensayo de Griess)</i>	18
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Soja

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa de la familia *Fabaceae*, originaria del continente asiático, cuyo mercado ha adquirido gran importancia, convirtiéndose en uno de los vegetales más cultivados y comercializados del mundo. Los Estados Unidos figuran como los principales productores de este vegetal, seguidos de Brasil, Argentina, China y India¹. Debido a su alto contenido en proteínas de elevada calidad (42%), superior al encontrado en otras legumbres^{2, 3} y su alto contenido en lípidos (22%), los principales productos derivados de la soja son el aceite y los productos proteicos². Sin embargo, el consumo de dichos productos sólo es significativo en los países asiáticos, mientras que, en el resto del mundo, su consumo se centra en individuos vegetarianos y veganos.

De acuerdo con los datos obtenidos por Franjee y Garnett⁴ expuestos en la Figura 1, a partir de los informes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y del Consejo Unido de la Soja (USB), la producción de granos de soja es destinada mayoritariamente al procesamiento (87%), mientras que el resto (13%) se emplea para la preparación directa de alimentos para consumo humano (6%), como tofu, leche de soja, tempeh, entre otros y para la elaboración de productos para alimentación animal (7%).

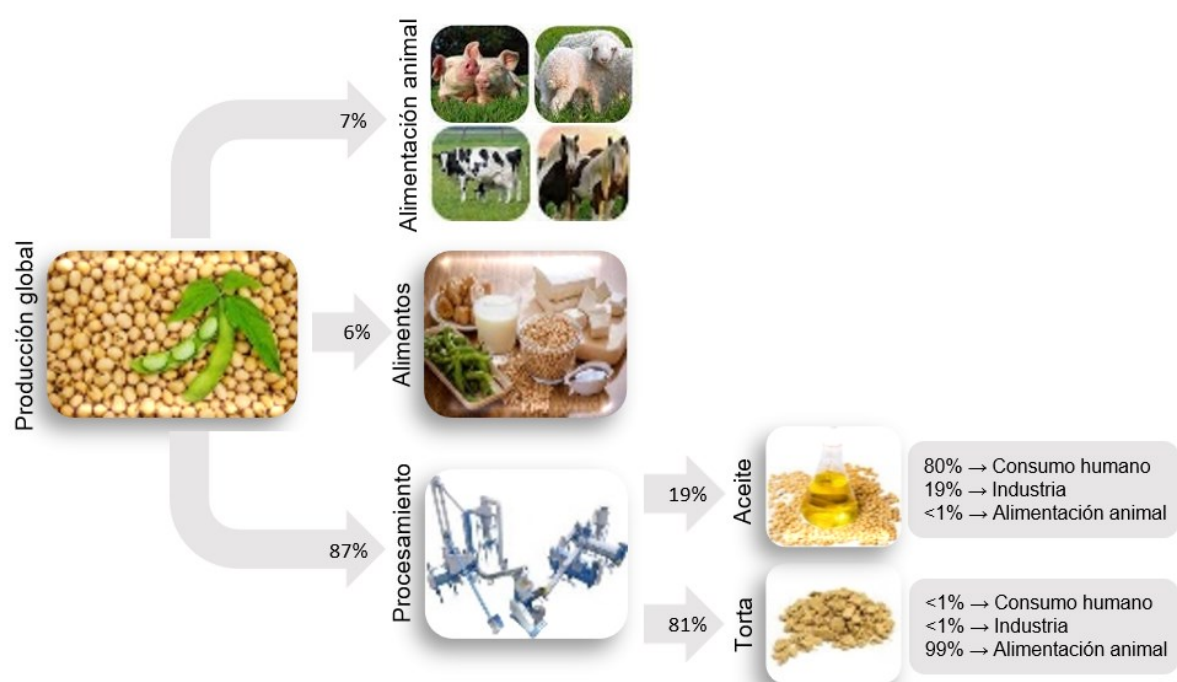


Figura 1. Destino de la producción de soja a nivel global⁴

Durante el procesamiento de los granos de soja tiene lugar la separación de la parte grasa de los demás componentes, obteniendo así el aceite de soja y la torta. El aceite de soja representa el 19%, destinándose el 80% al consumo humano, 19% a la industria y <1% al consumo animal. La torta, correspondiente a la soja desengrasada y rica en proteínas, es empleada mayoritariamente para la alimentación de animales (99%), siendo <1% destinado a la industria y al consumo humano.

En Asia la soja es consumida de manera tradicional, en forma de alimentos obtenidos por procesos de cocción, germinación y fermentación de los granos. Sin embargo, en occidente, la soja es consumida en forma de aceite o productos derivados de su harina, siendo esta última empleada inicialmente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales en las formas de concentrado y aislado proteicos⁵, existiendo también en la forma de texturizado proteico, obtenido mediante extrusión a partir de harina de soja o concentrado proteico⁶. En la Tabla 1 se muestran los valores de referencia para la composición centesimal del grano de soja seco⁷, de la harina de soja, del concentrado proteico y del aislado proteico⁵.

Tabla 1. Composición del grano seco de la soja y productos derivados

Componente	Tipo de producto			
	Grano seco	Harina	Concentrado proteico	Aislado proteico
	%	%	%	%
Proteína	35	56	72	96
Lípidos	19	1	1	0,1
Hidratos de carbono	28	33,5	17,5	0,3
Fibras	17	3,5	4,5	0,1

Se conoce la influencia que ejerce la variedad de la semilla sobre la composición del grano de soja y, en consecuencia, sobre la de los productos derivados. Este conocimiento ha potenciado la introducción de nuevas variedades con la finalidad de aumentar el contenido proteico de la soja y su calidad nutricional^{8,9}. Otros factores como el tipo de cultivo, cosecha, almacenamiento y procesamiento de los granos también son determinantes en dicha composición^{10,11}.

El consumo de soja en los países asiáticos se ha relacionado con una menor incidencia y prevalencia de distintos desórdenes crónicos¹². Las principales actividades fisiológicas descritas en la literatura para esta legumbre han sido asociadas con un impacto positivo frente a enfermedades metabólicas y cardiovasculares, salud ósea, algunos tipos de cáncer, función renal, síntomas de la menopausia, funciones cognitivas, salud mental, salud de la piel y fertilidad. Estos efectos beneficiosos han sido atribuidos a las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y otros componentes presentes en menor cantidad como el ácido fítico, las saponinas e isoflavonas, entre otros^{8,13}.

1.2. Proteínas y péptidos de la soja

Entre las proteínas presentes en la soja, las que se encuentran en mayor cantidad son las proteínas de almacenamiento denominadas globulinas (80-90%), específicamente la glicinina (40%) y la β -conglucininina (25%), asociadas principalmente a la reducción en los niveles de colesterol^{8,14}. En menor cantidad están presentes proteínas que desarrollan funciones de movilización de nutrientes almacenados y protección del vegetal, proteínas con carácter alergénico y antinutricional, como el inhibidor de proteasas Bowman-Birk (BBI) y el inhibidor de tripsina Kunitz (KTI), que representan un 6% y las lectinas, representando el 1-2% de las proteínas de la soja. Algunas de estas proteínas también han generado interés por su potencial actividad anticarcinogénica^{15,16}. Además de ser activas por sí mismas, las proteínas de soja son fuente de péptidos bioactivos, definidos como secuencias de aminoácidos inactivas dentro de la proteína precursora, pero que una vez liberados por procesos de hidrólisis, digestión o fermentación, ejercen distintos efectos fisiológicos. En la Figura 2 se muestra la forma de obtención de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de soja, así como las actividades descritas hasta el momento para dichos péptidos.

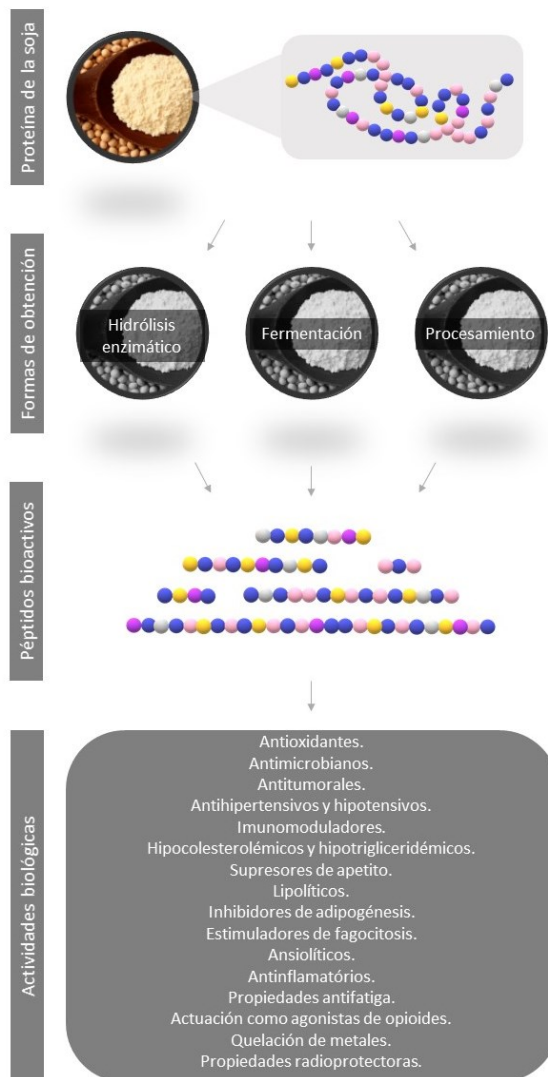


Figura 2. Métodos de obtención de péptidos bioactivos y sus principales actividades biológicas asociadas¹³

Gracias a los avances en el campo de los péptidos bioactivos, el conocimiento sobre nuevas secuencias con nuevas actividades y la elucidación de sus mecanismos de acción va aumentando, lo que favorece la incorporación de dichos péptidos en alimentos funcionales y nutraceuticos con potenciales efectos beneficiosos sobre la salud¹³.

1.3. Lunasina

Entre los péptidos presentes en la soja, el péptido lunasina se ha convertido en uno de los más estudiados y prometedores por su multifuncionalidad y su potencial aplicación en la promoción de la salud y la prevención de diversos desórdenes crónicos. Este péptido fue identificado por Galvez y colaboradores¹⁷, en el cotiledón de la soja, correspondiendo a la subunidad menor de la proteína codificada por el gen de la albúmina 2S (Gm2S-1), que origina una pre-proteína de 158 aminoácidos que consiste en un péptido señal, una subunidad pequeña (lunasina), un péptido de conexión y una subunidad grande (alisina o proteína rica en metionina)¹⁸. La secuencia correspondiente a la lunasina en su forma monomérica tiene un peso molecular de 4,8 KDa y contiene 43 aminoácidos

(SKWQHQQDSCRKQKQGVNLTPTCEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD), aunque algunos estudios recientes sugieren que la secuencia contiene 44 aminoácidos, con un residuo de asparagina en el extremo C-terminal¹⁹. La secuencia se ha dividido en cuatro regiones con funciones propias para cada una de ellas (Figura 3).

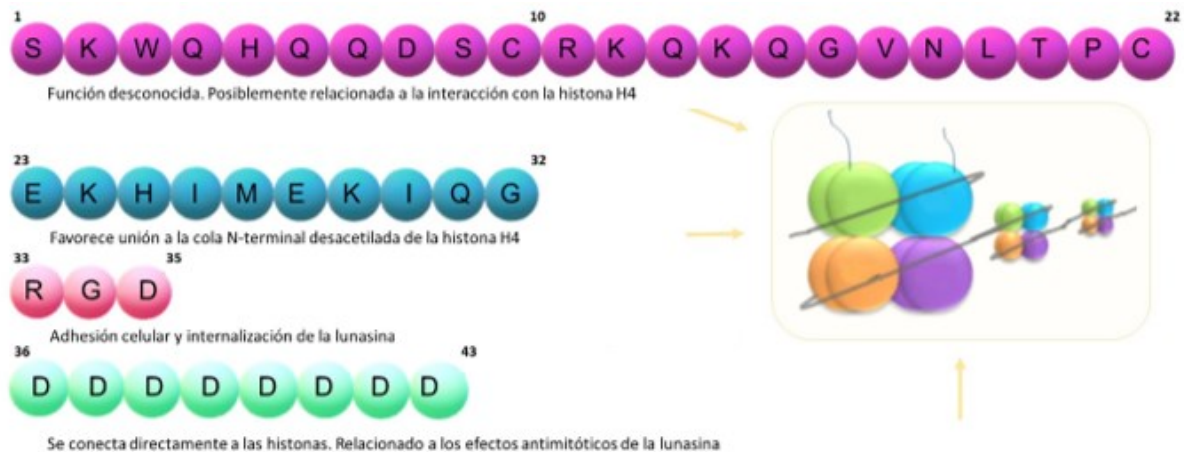


Figura 3. Representación de la secuencia de aminoácidos del péptido lunasina y sus funciones²¹

La actividad antimitótica del péptido fue observada durante los estudios encaminados a promover la calidad nutricional de la soja aumentando la biosíntesis de aminoácidos azufrados generalmente no abundantes en las legumbres. Esta actividad fue observada tanto en células vegetales como animales, lo que llevó al registro de la patente de esta secuencia, denominándola lunasina^{18,20}. Con el avance de los estudios sobre este péptido fue posible identificarlo en productos elaborados a partir de la soja²¹⁻²³ y en otros vegetales como el trigo, centeno, cebada, amaranto, triticale, avena y quinoa²⁴. Además de la actividad antimitótica, se han ido descifrando otras actividades, lo que ha llevado a considerar este péptido como multifuncional²⁵ (Figura 4).

Además de su multifuncionalidad, los estudios llevados a cabo con este péptido se han centrado en evaluar su digestibilidad y biodisponibilidad. Así, se ha descrito que los inhibidores de proteasas presentes en la soja, BBI y KTI ejercen un efecto protector sobre la lunasina, inhibiendo parcialmente su digestión por las enzimas gastrointestinales^{21,26}, tanto el péptido residual intacto como el fragmento 11-18 liberado durante dicha digestión son absorbidos a través del epitelio intestinal²⁷, alcanzando los órganos diana donde pueden ejercer sus efectos beneficiosos. Estos resultados *in vitro* han sido confirmados mediante modelos animales²⁸ y humanos. Así, se ha reportado la absorción de un 4,5% de la lunasina presente en 50 g de proteína de soja tras su consumo por un grupo de voluntarios sanos^{29,30}.

Las investigaciones desarrolladas hasta el momento con lunasina han empleado el péptido de origen sintético o bien extraídos de forma natural mediante el uso de solventes y posteriores técnicas cromatográficas^{32,33}. Se ha descrito que la fuente de partida y el método de extracción podría influir sobre la concentración del péptido, su bioactividad y biodisponibilidad³⁴. En los últimos años, la recombinación genética se ha perfilado como una alternativa más económica para la producción de este péptido^{35,36}. Encontrar nuevas formas de obtención y purificación más rentables posibilitaría profundizar en la investigación sobre la actividad biológica y disminuir el coste de los productos comercializados que contienen este y otros péptidos bioactivos.

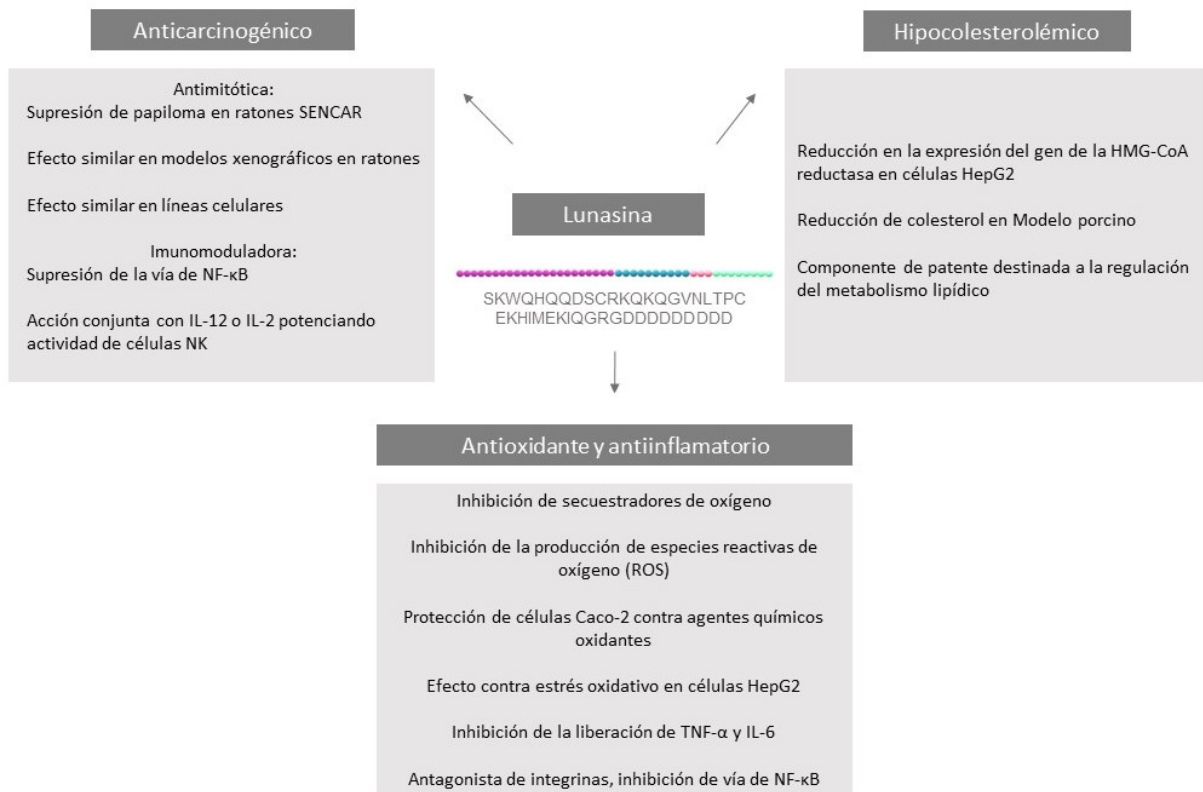


Figura 4. Multifuncionalidad del péptido lunasina³¹

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1. La extracción con tampón fosfato salino (PBS) asistida por ultrasonido a partir de productos comerciales de soja produce extractos enriquecidos en el péptido lunasina.
2. La ultrafiltración secuencial posibilita la obtención de fracciones de mayor bioactividad debido a la presencia de péptidos de bioactivos de tamaño intermedio y/o pequeño.
3. Los extractos enriquecidos en el péptido lunasina son capaces de ejercer efectos inmunomoduladores en macrófagos RAW 264.7.

El objetivo principal del presente trabajo fue la **evaluación de la bioactividad de extractos enriquecidos en lunasina obtenidos a partir de productos comerciales de soja y de las fracciones conteniendo péptidos de distinto peso molecular obtenidas mediante ultrafiltración**. Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos y se diseña el plan de trabajo descrito en la Figura 5:

1. Obtención de extractos enriquecidos en lunasina a partir de distintos productos comerciales de soja por extracción en solvente acuoso y asistida por ultrasonido, seguida de ultrafiltración secuencial para obtención de fracciones de contenido proteico mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa.
2. Caracterización, mediante electroforesis desnaturalizante, del perfil proteico de los extractos obtenidos y sus fracciones.
3. Identificación del péptido lunasina en los extractos mediante Western Blot (WB).
4. Evaluación de actividad antioxidante de los extractos y sus fracciones mediante dos métodos bioquímicos, de determinación de la capacidad neutralizante de radicales peroxilo (ORAC) y radicales ABTS^{•+} (ABTS).
5. Estudio del efecto dosis-dependiente de los extractos enriquecidos en lunasina en la producción de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 mediante el ensayo de Griess.

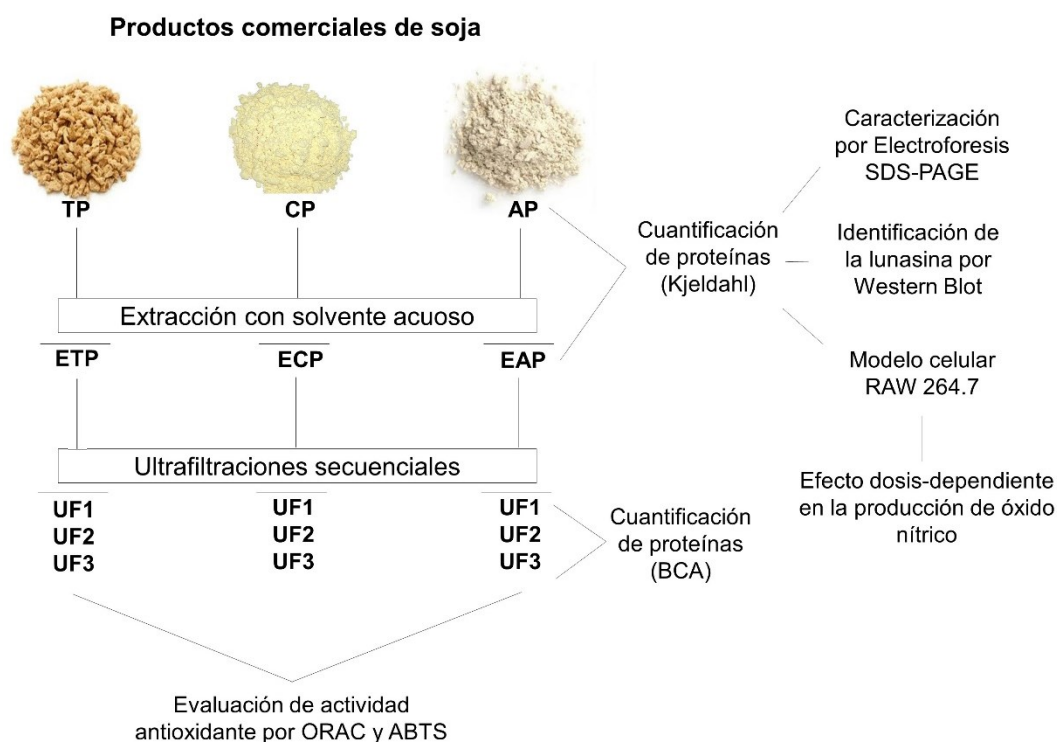


Figura 5. Plan de trabajo establecido para obtención, caracterización y estudio de la bioactividad de extractos obtenidos a partir de productos comerciales de soja.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lunasina sintética y muestras comerciales de soja

La lunasina empleada fue sintetizada por DGpeptides Co., Ltd (Hangzhou, R.P. China), con una pureza del 95,2%.

Se emplearon los siguientes productos comerciales de soja cedidos por la empresa Emilio Peña Aditivos Alimentarios S.A. (EPSA, Valencia, España), cuya información contenida en los certificados de análisis se muestran en la Tabla 2:

- Texturizado Proteico de Soja (SOPROTEX-N) (TP)
- Concentrado proteico de Soja HC 200 (CP)
- Aislado de Proteína de Soja TW900 emulsión (AP)

Tabla 2. Certificado de análisis de las muestras comerciales

Texturizado Proteico de Soja (SOPROTEX-N)	
Lote EPSA: No informado Fabricación: 09/05/2019	
Características	Resultados
Granulación	1,0-4,0mm
Proteína*	54,9%
Humedad	5,8%
Grasa*	0,8%
Fibras*	2,4%
Salmonella spp	Negativo en 25 g
Hongos	Máximo 500 ufc/g
Concentrado Proteico de Soja HC 200	
Lote EPSA: 217522 Fabricación: 18/11/2017	
Características	Resultados
Granulación	94 por 200 mesh
Proteína*	69,2%
Humedad	5,5%
Grasa*	0,6%
Fibras*	3,5%
Bacterias totales	Máximo 50000 ufc/g
Salmonellae	Negativo en 25 g
Enterobacteriaceae	Máximo 100 ufc/g
Aislado de proteína de soja TW900 emulsión	
Lote EPSA: 230516 Fabricación: 19/09/2018	
Características	Resultados
Granulación	97 por 100 mesh
Proteína*	90%
Humedad	6%
Ph	7,15
Bacterias totales	860 ufc/g
Coliformes	Negativo
Salmonellae	Negativo
Melamina	No detectado

* En base seca.

3.2. Obtención y fraccionamiento de extractos procedentes de los productos comerciales

3.2.1. Extracción con solvente acuoso

Se llevó a cabo la obtención de extractos a partir de las tres muestras comerciales, empleado un tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M y pH 7,4. Para ello, 5 g del producto comercial fueron disueltos en 50 mL de PBS, agitando la solución durante 3 horas a temperatura ambiente. Para optimizar la extracción, se procedió a la sonicación en baño de las soluciones durante 60 minutos. Tras la centrifugación a 12000 x g por 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles mediante filtración con papel de filtro, desechando el precipitado. Dicho sobrenadante fue liofilizado y conservado a -20°C para la realización de los ensayos. Se realizó la extracción por duplicado para las muestras TP y AP, obteniendo los extractos denominados ETP E1 y ETP E2 para TP y EAP E1 y EAP E2 para AP. En el caso del concentrado CP, se llevó a cabo una única extracción (ECP).

3.2.2. Fraccionamiento de los extractos mediante ultrafiltración

Los extractos obtenidos fueron sometidos a fraccionamiento mediante ultrafiltración obteniendo tres fracciones: >10KDa (UF1), 3-10 kDa (UF2), <3KDa (UF3). El primer fraccionamiento se llevó a cabo empleando el dispositivo Amicon® Ultra-15, 10K Millipore® (Burlington, USA), mediante centrifugación a 5000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las especificaciones del fabricante. De este modo, se obtuvo la fracción UF1 y la fracción <10KDa que fue sometida a un nuevo proceso de fraccionamiento empleando el dispositivo Vivaspin® 20mL Sartorius® (Gottingen, Alemania) y centrifugación a 6000 x g durante 90 minutos a temperatura ambiente, siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. Tras esta segunda fase de fraccionamiento se obtuvieron las fracciones UF2 y UF3.

3.3. Caracterización de los extractos y las fracciones

3.3.1. Determinación del contenido proteico

El contenido proteico de las muestras comerciales de soja y de los extractos obtenidos a partir de ellas fue determinado en la Unidad de Técnicas Bioanalíticas (BAT) del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) mediante el método Kjeldahl. A partir del contenido en nitrógeno obtenido mediante este análisis, se calculó el contenido proteico aplicando el factor de conversión de 5,71³⁷. En el caso de las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración, el contenido proteico se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Para ello, se empleó el Pierce™ BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific™ (Waltham, USA), siguiendo las orientaciones del fabricante y empleando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Se emplearon placas de 96 pocillos Thermo Scientific™. Para la realización del ensayo fueron preparadas diluciones de BSA en agua ultrapura (tipo 1) con concentraciones entre 25 y 1000 µg/mL. Las muestras fueron analizadas a distintas concentraciones entre 1 y 4 mg/mL, disueltas en agua ultrapura (tipo 1). En la placa se añadieron 25 µL de cada concentración del estándar por duplicado y de las muestras por triplicado, añadiendo posteriormente 200 µL del reactivo de trabajo, preparado a partir de la mezcla del reactivo BCA A y B, en proporción respectiva de 50:1 (v:v). La microplaca fue protegida de la luz y se procedió a su incubación durante 30 minutos a 37°C. La absorbancia se midió a 570 nm en lector de placas Multiskan™ FC Thermo Scientific. Con los valores de absorbancia obtenidos para el estándar se representó la curva absorbancia vs concentración, que permitió la extrapolación de los valores de proteína presentes en las fracciones de nuestro estudio. Los resultados fueron expresados en µg/mL y convertidos a porcentaje de proteínas.

3.3.2. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis fue realizada en cubeta de electroforesis Criterion™ Cell Bio-Rad (Hercules, USA), empleando el tampón XT MES 1x preparado mezclando 50 mL de XT MES 20x (Bio-Rad) con 950 mL de agua ultrapura (tipo 1). Las muestras fueron diluidas a una concentración de 1 mg de proteína/mL en el tampón de muestra preparado con Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8), dodecilsulfato sódico (SDS) 1,6% (p:v), glicerol 8% (v:v), azul de bromofenol 0,02% (p:v), agua ultrapura (tipo 1) y β -mercaptoetanol 2% (v:v) y sometidas a tratamiento térmico en el Eppendorf™ Thermomixer® R (Hamburg, Alemania) a 100°C en agitación continua durante 5 minutos y centrifugación durante 5 segundos. El marcador de pesos moleculares empleado fue el Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad), correspondiente a una mezcla de 12 proteínas recombinantes con pesos moleculares entre 2-250KDa.

Las muestras (10 μ L en el caso del marcador y 40 μ L en el caso de las muestras) se cargaron en el gel de electroforesis al 12% Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel (Bio-Rad) y se llevó a cabo la electroforesis a 100 V, 5 minutos y 150 V, 50 minutos. Los geles fueron lavados con agua ultrapura (tipo 1), teñidos con InstantBlue® Commassie Protein Stain Abcam (Cambridge, UK) y lavados otra vez para la obtención de imágenes, empleando el lector Molecular Imager® Versadoc™ MP 4000 (Bio-Rad). Las imágenes fueron analizadas mediante el software image lab 6.1 (Bio-Rad) para determinación de los pesos moleculares de las bandas visualizadas, utilizando regresión lineal (semi-log) para obtención del valor de R^2 de la curva patrón. A partir de los pesos moleculares obtenidos fue realizado el análisis comparando con trabajos conducidos anteriormente con extractos derivados de soja y una búsqueda en la base de datos Universal Protein – UniProt³⁸ para soja (*Glycine max*).

3.3.3. Análisis proteómico

El análisis proteómico fue realizado por el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa – CBMSO que pertenece al ProteoRed – PRB3-ISCIII financiado por el PT17/0019 del PE I+D+i 2013-2016, fundado por ISCII y ERDF. Se identificaron y caracterizaron las proteínas presentes en las muestras mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), empleando geles de poliacrilamida al 10% y geles concentradores para digestión y desalado. Con los resultados, se realizó la búsqueda en la base de datos UniProt³⁸ (*Glycine max*) (versión 12/21/2020, 74863 protein sequence entries).

3.4. Identificación y cuantificación del péptido lunasina

La identificación y cuantificación del péptido lunasina se llevó a cabo mediante Western Blot (WB), ajustando las condiciones de voltaje, tiempo, materiales y reactivos de acuerdo a este ensayo. Como tampón de muestra se empleó Tris-tricina (Bio-Rad) con 2% de β -mercaptoetanol, añadidos en el momento de preparación de las muestras, que una vez disueltas fueron sometidas a tratamiento térmico a 100°C y centrifugación durante 5 segundos. El marcador empleado fue el Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad). La curva patrón se preparó con lunasina sintética a concentraciones entre 12,5 y 100 μ M. El tampón de electroforesis fue 1x Tris/Tricine/SDS (TTS), preparado a partir del 10x TTS (Bio-Rad). 10 μ L de marcador, lunasina sintética a las distintas concentraciones y muestras, correspondiente a 50 μ g de proteína fueron cargados en el pocillo correspondiente del gel Criterion™ Precast Gel 16.5% Tris-Tricine/Peptide (Bio-Rad). Se aplicó un voltaje de 60 V durante 2 minutos y posteriormente, 100 V durante 3 horas.

La transferencia se llevó a cabo empleando una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de GE Healthcare (Chicago, USA) previamente tratada con metanol al 100% y agua

ultrapura (tipo 1). Para la preparación del tampón de transferencia se emplearon 5,8 g de Trizma Base, 2,9 g de glicina y 20% de metanol. Se sumergieron el gel, la membrana y los filtros (Extra thick blot paper filter paper, Bio-Rad) en el tampón de transferencia durante 30 minutos y posteriormente se llevó a cabo la transferencia empleando el Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad).

Tras la transferencia, la membrana fue sometida a bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, empleando una solución de Tris Buffered Saline 1x con 1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (TBST 1%) y leche desnatada 5% (p/v) (TBST-LD 5%). Tras lavar tres veces con TBST 1%, la membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la lunasina (Biomedal, Sevilla, España) a una relación 1:12000 (v:v) disuelto en TBST-LD 3% durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario de ratón anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) a una dilución 1:5000 en TBST-LD 3%, durante 1 hora. Tras tres lavados de la membrana, se empleó el reactivo de revelado ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva Amersham™, Buckinghamshire, UK) y las imágenes se tomaron empleando el lector Molecular Imager® Versadoc™ MP 4000 (Bio-Rad), siendo analizadas mediante el software de análisis Quantity One 1-D (Bio-Rad), para realizar la integración de las bandas y el análisis semicuantitativo del contenido en lunasina presente en cada muestra.

3.5. Evaluación de la actividad biológica de los extractos y las fracciones

3.5.1. Actividad antioxidante (ensayo ORAC)

Este ensayo se basó en el protocolo descrito por Hernández-Ledesma y colaboradores³⁹, con algunas modificaciones. Para la disolución de los reactivos y las muestras se empleó PBS 0,075 M a pH 7,4. La fluoresceína disodio 1166,1 µM (solución madre) fue preparada con 0,01097 g de fluoresceína (Sigma-Aldrich) en 25 mL de PBS y conservada a 4°C protegida de la luz durante un tiempo máximo de 1 mes. El día del ensayo se preparó la solución de trabajo con 100 µL de la solución madre y enrasando a 10 mL con PBS. Para la solución de 6-hidroxi-2,5,7,8-ácido de tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) empleado como estándar, fueron pesados 0,0125 g de Trolox (Sigma-Aldrich), disueltos en 1 mL de metanol y enrasados hasta 50 mL con PBS. Las soluciones de fluoresceína y Trolox fueron conservadas protegidas de la luz a 4°C hasta el momento de su uso. En placas de 96 pocillos Costar® 3915 (Corning, USA) se añadieron 20 µL de estándar o muestra (a distintas concentraciones) y 120 µL de la solución de fluoresceína 116,61 nM, incubando la placa en oscuridad a 37°C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 60 µL del radical 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH), preparado con 0,13018 g de AAPH (Sigma-Aldrich) en 10 mL de PBS y la placa se incubó durante 95 minutos a 37°C, leyendo la fluorescencia cada minuto a las longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente, en el lector de placas Fluostar Optima BMG Labtech (Ortenberg, Alemania). Con los valores de fluorescencia se calculó el área bajo la curva (AUC) que se representó en función de la cantidad de Trolox (µmol) o de muestra (mg proteína). El valor de la pendiente de la muestra se dividió entre la pendiente correspondiente al Trolox, obteniéndose el valor ORAC, expresado como µmol equivalente de Trolox (ET)/mg de proteína. Cada muestra fue analizada por duplicado empleando seis concentraciones de proteína en cada ensayo para representar la curva.

3.5.2. Actividad antioxidante (ensayo ABTS)

Para la realización de este ensayo, el radical de 2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) (Sigma-Adrich) fue preparado el día previo al ensayo, mezclando 6 mL de ABTS 7 mM y 3 mL persulfato potásico (Sigma-Aldrich) 2,45 mM, conservando la solución a temperatura ambiente y oscuridad durante toda la noche. La solución madre de Trolox,

empleado como estándar, fue preparada pesando 5 mg y disolviendo en 10 mL de metanol y 10 mL de agua ultrapura (tipo 1). A partir de dicha solución se prepararon las distintas diluciones a 25, 50, 75, 10, 150 y 200 μM de concentración, en agua ultrapura (tipo 1). Las muestras se diluyeron en PBS 5 mM a distintas concentraciones. Un volumen de 20 μL de muestra (o PBS o Trolox) fue añadido a placas transparentes de 96 pocillos (Thermo Scientific™), añadiendo posteriormente 180 μL de la solución del radical ABTS (cuya absorbancia a 734 nm previamente se ajustó a $0,70 \pm 0,02$). Tras incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, la absorbancia fue medida a 734 nm en el lector de placas Biotek Synergy HT (Winosk, USA). Se representaron los valores de absorbancia con respecto a la cantidad de Trolox (μmol) o de muestra (mg proteína) y la pendiente de la muestra se dividió entre la pendiente del Trolox, obteniendo los valores de la capacidad antioxidante de equivalentes al Trolox (TEAC), expresados como $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína. Cada muestra fue analizada por duplicado empleando seis concentraciones de proteína en cada ensayo para representar la curva.

3.5.3. Modelos celulares

Se emplearon macrófagos de ratón RAW 264.7 procedentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD, USA), cultivados en medio Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y sin piruvato sódico (Lonza™, Basel, Suiza) suplementado con 5% de antibiótico penicilina, estreptomina y anfotericina (DMEM + PSA) y 10% suero fetal bovino (FBS) de Biowest (Nuaille, FR) (DMEM completo), en frascos de cultivo celular de 75 cm^2 tratados de VWR (Radnor, USA), mantenidas en incubador a 37°C y 5% de CO_2 .

3.5.3.1. Determinación de óxido nítrico (ensayo de Griess)

Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos tratadas (Sarstedt) a la densidad de 1×10^5 en medio DMEM completo e incubadas durante 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con las muestras disueltas en medio DMEM + PSA a distintas concentraciones. Como control se empleó medio DMEM + PSA y como control positivo se empleó lipopolisacárido bacteriano (LPS) (10 ng/mL) disuelto en DMEM + PSA. Las placas fueron incubadas durante 24 horas, pasadas las cuales se llevó a cabo el ensayo de Griess. Para ello, 100 μL de los sobrenadantes se añadieron a una placa de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Thermo Scientific), añadiéndose 100 μL del reactivo de Griess modificado (Sigma-Aldrich) y dejando incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 540 nm en el lector Synergy HT Biotek. Se empleó como patrón una curva de nitrito de sodio elaborada con concentraciones entre 3,125 y 100 μM . Los resultados se expresaron como μM de óxido nítrico (NO). Se emplearon un total de 12 pocillos por condición ensayada.

3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el software GraphPad Prism 9.1 (San Diego, USA) a través del cual se ha realizado análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de comparación múltiple de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los extractos y las fracciones

Los valores de proteína total de los extractos y las fracciones obtenidas por ultrafiltración se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de proteína de las muestras comerciales, sus extractos y las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración

Muestra	Acrónimo	Proteína (%)
Texturizado de proteína de soja	TP	46,18 ± 0,03
Extracto del texturizado de proteína de soja 1	ETP E1	10,09 ± 0,25
Extracto del texturizado de proteína de soja 2	ETP E2	10,91 ± 0,17
Fracción >10 kDa del extracto del texturizado	ETP UF1	13,18 ± 0,83
Fracción 3-10 kDa del extracto del texturizado	ETP UF2	4,02 ± 0,01
Fracción <3 kDa del extracto del texturizado	ETP UF3	2,16 ± 0,01
Concentrado de proteína de soja	CP	59,29 ± 0,72
Extracto del concentrado proteína de soja	ECP	14,44 ± 1,22
Fracción >10 kDa del extracto del concentrado	ECP UF1	11,48 ± 0,40
Fracción 3-10 kDa del extracto del concentrado	ECP UF2	3,09 ± 0,01
Fracción <3 kDa del extracto del concentrado	ECP UF3	0,68 ± 0,01
Aislado de proteína de soja	AP	75,59 ± 0,10
Extracto del aislado de proteína de soja 1	EAP E1	35,49 ± 0,10
Extracto del aislado de proteína de soja 2	EAP E2	34,81 ± 1,26
Fracción >10 kDa del extracto del aislado	EAP UF1	33,99 ± 1,61
Fracción 3-10 kDa del extracto del aislado	EAP UF2	3,10 ± 0,01
Fracción <3 kDa del extracto del aislado	EAP UF3	1,30 ± 0,01

Debido al proceso de obtención de las muestras comerciales, el contenido proteico mayor correspondió al aislado de proteína de soja (75,59%), seguido del concentrado proteico (59,29%) y finalmente, el texturizado (46,18%). Las diferencias observadas entre los valores determinados en el laboratorio y aquellos determinados por la empresa pudieron ser debidos a variaciones en las condiciones del método de análisis por Kjeldahl o bien, al diferente factor de conversión del nitrógeno a proteína empleado en nuestro análisis.

Mediante el empleo de PBS, se logró la extracción de proteínas solubles de las muestras comerciales que supusieron el 22% para el texturizado, 24% para el concentrado y el 47% para el aislado, indicando que la mitad de las proteínas presentes en dicho aislado eran solubles en la solución acuosa empleada para la extracción. A partir de los extractos y empleando membranas de distinto tamaño de corte, se separaron las fracciones de proteína mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa, ésta última correspondiente a péptidos de pequeño peso molecular. Como puede observarse en la Tabla 3, la fracción correspondiente a péptidos de gran tamaño y proteínas (fracción mayor a 10 kDa) fue la que presentó el mayor contenido proteico. Este resultado fue confirmado tras el análisis mediante SDS-PAGE en el que pudo observarse que el perfil de la fracción >10 kDa fue similar al del extracto completo, indicando que la mayoría de las proteínas contenidas en dichos extractos fueron de gran tamaño (Figura 6A). Sin embargo, en la fracción UF2 correspondiente a proteínas y péptidos de tamaño entre 3 y 10 kDa, pudieron visualizarse ligeras bandas correspondientes a proteínas de mayor tamaño al esperado, indicando que el proceso de

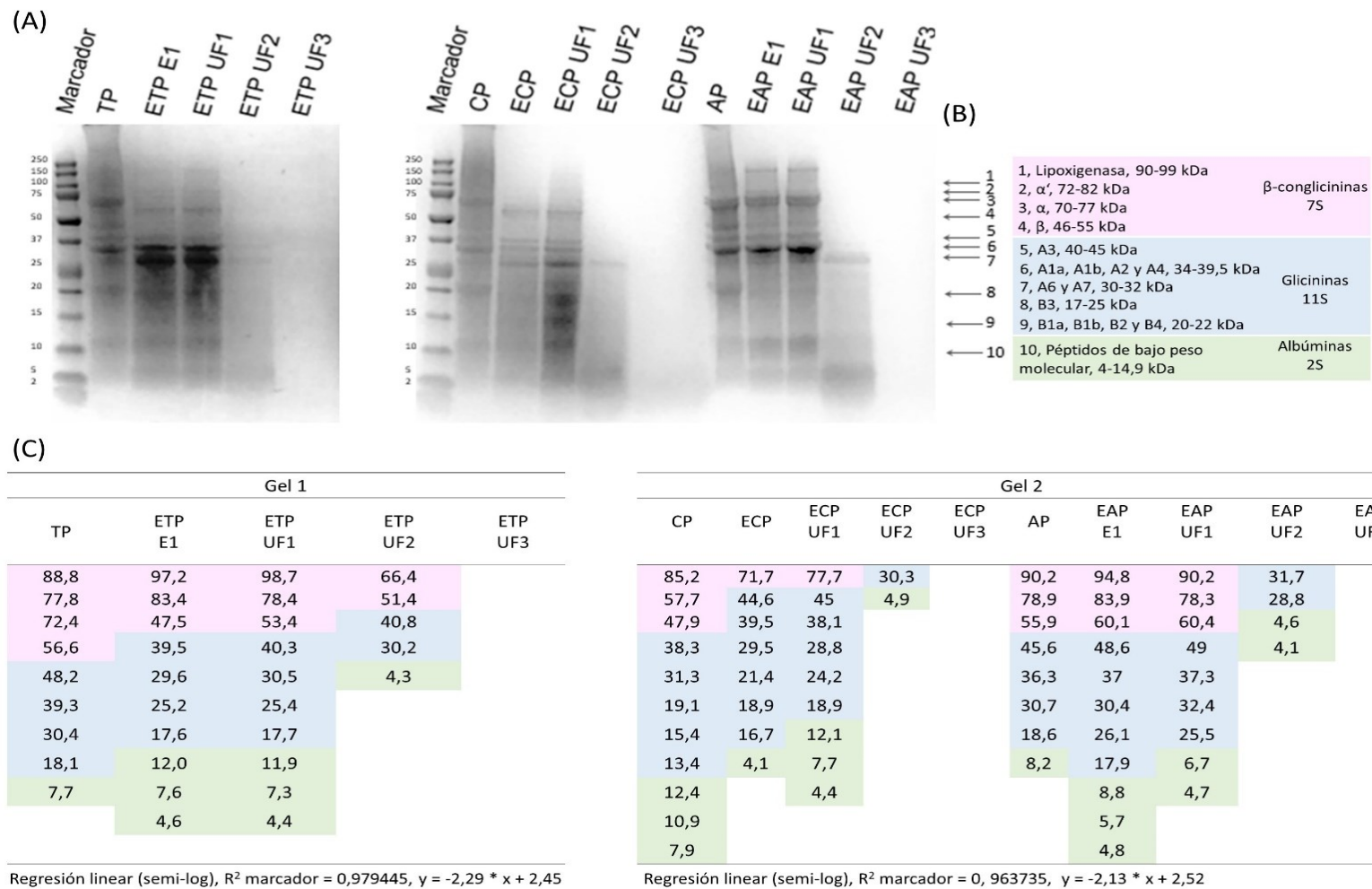


Figura 6. (A) Electroforesis SDS-PAGE en gel al 12% de las muestras comerciales, sus extractos y ultrafiltraciones. **(B)** Principales proteínas asociadas a la soja con bandas correspondientes identificadas en el gel. **(C)** Pesos moleculares obtenidos para cada una de las muestras en método de regresión lineal (semi-log), R^2 correspondiente a la curva estándar del marcador en cada gel y ecuación utilizada.

ultrafiltración no permitió una separación completa de las proteínas en función de su tamaño. Ninguna banda fue observada para la fracción UF3 correspondiente a péptidos de bajo peso molecular que, debido a las condiciones del ensayo, no pudieron ser visualizados.

A partir de la movilidad electroforética relativa (Rf) del marcador de pesos moleculares fue posible realizar la regresión lineal semi-logarítmica e interpolación con los valores de Rf obtenidos para las bandas detectadas en las distintas muestras y así determinar el peso molecular de cada una de ellas, identificando las principales proteínas descritas previamente en la literatura con pesos moleculares aproximados, siendo empleados rangos de correspondencia a ellos (Figuras 6B, C). Los rangos fueron determinados de acuerdo con los datos reportados en la literatura, en la base de datos UniProt³⁸ y en los resultados obtenidos en este trabajo en el programa Image Lab 6.1 (Bio-Rad) para todas las muestras. Las proteínas presentes en la soja son clasificadas en fracciones de acuerdo con sus constantes de sedimentación, siendo las principales la 7S (β -conglucininas), 11S (glicininas) y 2S (albúminas). Las bandas detectadas en el ensayo de electroforesis asociadas a las β -conglucininas presentaron pesos moleculares entre 48 y 80 kDa, con la enzima lipoxigenasa que es comúnmente descrita en conjunto con esta fracción con un peso molecular entre 90 y 99 kDa. Para las 11S (glicininas) están presentes subunidades ácidas y básicas, las ácidas van de 30 a 45 kDa y las básicas de 20 a 22 kDa. Los péptidos de bajo peso molecular están en la parte asociada a las albúminas 2S, con pesos moleculares entre 4 y 14,9 kDa.

Para una identificación más exhaustiva de las proteínas contenidas en las muestras, éstas fueron analizadas mediante MS en el Servicio de Proteómica del CBMSO. Como ejemplo, en el caso de la muestra EAP, a partir de 535 correspondencias con la base de datos en UniProt³⁸, se pudieron identificar 373 proteínas y fragmentos de ellas, con un porcentaje de cobertura entre el 3 y 79%. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para la muestra EAP para proteínas con un % de cobertura superior al 50%. Además, un total de 162 señales no pudieron relacionarse con ninguna proteína conocida. Los resultados confirmaron la presencia de glicininas y β -conglucininas, además de identificarse con un alto % de cobertura la 7S globulina básica y los inhibidores de tripsina y el KTI. Entre las proteínas detectadas con un % inferior de cobertura se encontraron la lipoxigenasa y otras enzimas. La albúmina 2S, proteína de la que deriva el péptido lunasina fue identificada con un % de cobertura del 14% para la muestra TP, 27% para AP y 49% para la muestra EAP (Figura 7). Estos resultados indican que la extracción con PBS permitió enriquecer la muestra en este péptido de interés. Entre los péptidos que forman parte de la secuencia de la lunasina e identificados en la muestra EAP se encontraron los fragmentos ¹³QLQGVNLTPEK²⁴ y ³WQHQQDSCR¹².

4.2. Identificación y cuantificación del péptido lunasina

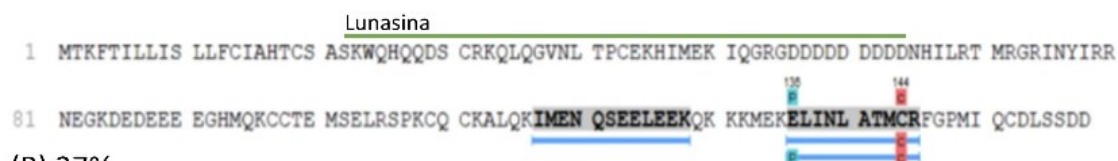
La identificación de lunasina se llevó a cabo mediante Western Blot (WB), empleando un anticuerpo policlonal específico para este péptido. En la Figura 8 se muestran las bandas correspondientes al péptido en las muestras comerciales y sus extractos, empleando lunasina sintética como patrón. Tanto la forma monomérica como la dimérica pudieron observarse en la muestra AP y en los extractos obtenidos a partir de las tres muestras. Sin embargo, sólo la forma monomérica pudo detectarse en las muestras CP y TP, posiblemente debido a que la menor concentración a la que se encuentra no permitió su visualización mediante este método de análisis. Tras la integración de la intensidad de las bandas a partir de la curva patrón obtenida con la lunasina sintética se llevó a cabo la cuantificación de la concentración del péptido en las distintas muestras, mostrándose los resultados en la Tabla 5.

Tabla 4. Proteínas identificadas en el extracto obtenido a partir del aislado proteico de soja (EAP) mediante análisis proteómico y búsqueda en la base de datos UniProt³⁸, con una cobertura superior al 50%.

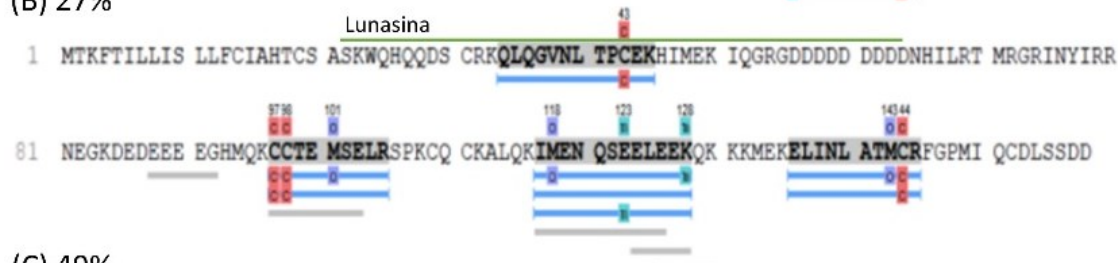
Proteína de soja	Masa media	Cobertura ¹ (%)
Glycinin G1	55706	79
Glycinin G2	54391	71
Beta-conglycinin alpha subunit 2	70306	68
Beta-conglycinin alpha subunit 1	70306	68
Bet_v_1 domain-containing protein	16761	68
Trypsin inhibitor B	20041	64
Beta-conglycinin alpha' subunit	72228	61
Glycinin G4	63797	61
Trypsin inhibitor A	24005	61
Glycinin G3	54242	60
Kunitz trypsin inhibitor	24076	60
Glycinin G5	57956	58
Nucleoside diphosphate kinase	16512	56
Basic 7S globulin	46393	54

¹ la cobertura depende del número de péptidos identificados para la proteína y de su peso molecular

(A) 14%



(B) 27%



(C) 49%



Figura 7. Cobertura (%) de las muestras (A) TP, (B) AP y (C) EAP para la albúmina 2S.

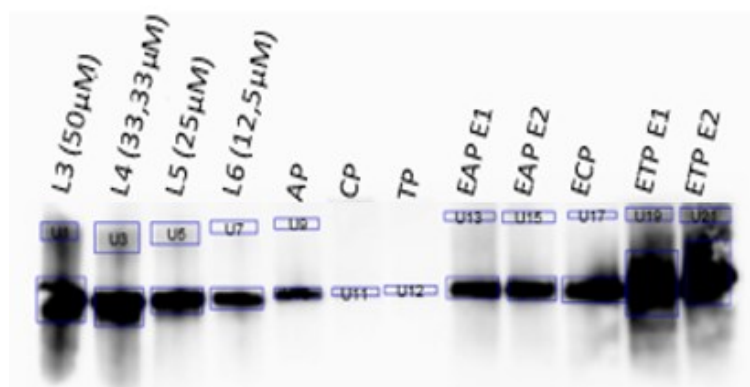


Figura 8. Resultados del Western Blot empleando el anticuerpo policlonal de lunasina para los productos comerciales de soja y sus extractos. La lunasina sintética fue empleada como estándar a concentraciones entre 12,5 y 50 μM ($R^2 = 0,9954$).

Tabla 5. Concentración del péptido lunasina (expresada como mg/g de proteína y mg/g de producto) determinada en las muestras de soja comerciales y los extractos obtenidos a partir de ellas

Muestra (concentración proteína)	mg lunasina/g proteína	mg lunasina/g producto
TP (50 μg proteína)	9,75	4,50
ETP E1 (50 μg proteína)	145,73	14,70
ETP E2 (50 μg proteína)	188,32	20,55
CP (50 μg proteína)	11,48	6,81
ECP (50 μg proteína)	62,88	9,08
AP (50 μg proteína)	12,28	9,28
EAP E1 (50 μg proteína)	64,93	23,04
EAP E2 (50 μg proteína)	60,40	21,03

Como puede observarse, la mayor cantidad de lunasina entre los productos comerciales se presentó en la muestra AP con una concentración de 9,28 mg lunasina/g de producto. Tras la extracción con PBS, se logró un enriquecimiento en el péptido hasta alcanzar una concentración superior a 20 mg lunasina/g producto. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante el análisis proteómico. Igualmente, se logró enriquecer los extractos obtenidos a partir de TP y CP, con concentraciones de lunasina (en mg/g producto) similares entre ETP y EAP. Estos resultados indican que ambas muestras, aislado y texturizado de proteína de soja podrían ser una fuente importante para la extracción del péptido.

4.3. Actividad biológica de los extractos y las fracciones

4.3.1. Actividad antioxidante mediante los ensayos ORAC y ABTS

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las muestras comerciales de soja y de las fracciones obtenidas por ultrafiltración mediante dos ensayos bioquímicos, ORAC y ABTS, empleando en ambos métodos el Trolox como estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Entre los extractos de las muestras comerciales, aquel obtenido a partir del texturizado fue el que presentó una mayor actividad antioxidante en ambos ensayos.

Tabla 6. Actividad antioxidante, expresada como μmol equivalente de Trolox (ET)/mg de proteína, de los extractos obtenidos a partir de las muestras comerciales de soja y de las fracciones obtenidas a partir de ellos mediante ultrafiltración

Muestras	ORAC Media \pm DE	TEAC Media \pm DE
ETP E1	1,32 \pm 0,05	0,30 \pm 0,00
ETP E2	1,05 \pm 0,03	0,32 \pm 0,01
ETP UF1	1,15 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01
ETP UF2	2,40 \pm 0,02	0,57 \pm 0,03
ETP UF3	3,97 \pm 0,21	0,83 \pm 0,06
ECP	0,39 \pm 0,03	0,10 \pm 0,01
ECP UF1	0,79 \pm 0,06	0,28 \pm 0,02
ECP UF2	1,22 \pm 0,09	0,33 \pm 0,02
ECP UF3	1,89 \pm 0,13	0,70 \pm 0,02
EAP E1	0,57 \pm 0,04	0,11 \pm 0,00
EAP E2	0,67 \pm 0,04	0,12 \pm 0,01
EAP UF1	0,83 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00
EAP UF2	2,88 \pm 0,05	0,75 \pm 0,04
EAP UF3	6,43 \pm 0,29	1,62 \pm 0,01

DE: desviación estándar

Los valores de ORAC fueron de 1,32 y 1,05 μmol ET/mg de proteína para ETP E1 y ETP E2, respectivamente y los valores de TEAC fueron 0,30 y 0,32 μmol ET/mg de proteína. Tras la ultrafiltración y consecuente separación de fracciones en función de su tamaño molecular, pudo observarse un incremento de la actividad para las fracciones UF2 (3-10 kDa) y UF3 (< 3 kDa). Así, la mayor actividad neutralizante de radicales peroxilo pudo determinarse en la fracción que contenía péptidos de pequeño tamaño, obteniéndose unos valores de ORAC de 3,97, 1,89 y 6,43 μmol ET/mg de proteína para las muestras ETP UF3, ECP UF3 y EAP UF3, respectivamente. Para ETP UF3 el incremento en la actividad antioxidante fue de 235,02%, de 364,51% para ECP UF3 y de 937,09% para EAP UF3 respecto a los extractos iniciales. De igual modo, la capacidad neutralizante de radicales ABTS fue superior en dichas fracciones, con valores TEAC de 0,83, 0,70 y 1,62 μmol ET/mg de proteína, respectivamente, que representan un aumento de 167,74%, 600% y 1308% en la actividad antioxidante medida a través de este método (Tabla 6).

4.3.2. Actividad inmunomoduladora en un modelo celular

4.3.2.1. Determinación de óxido nítrico (ensayo de Griess)

En la Figura 9 se pueden observar los resultados obtenidos en ensayo para determinación de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 sin estimular y estimulados con LPS y tratados con los extractos ETP, ECP y EAP a diferentes concentraciones. En condiciones basales no se detectó la producción de óxido nítrico (NO) por parte de los macrófagos RAW 264.7. Sin embargo, tras la estimulación con LPS (10 ng/mL), el nivel de NO determinado fue de 29,29 μM \pm 2,66. En el caso de los extractos ensayados, los resultados variaron en función del tipo de muestra. Así, ninguna de las tres concentraciones ensayadas de ETP provocaron cambios en los niveles de NO con respecto al control negativo (Figura 9A). Sin embargo, pudo observarse un efecto inductor dosis-dependiente en la producción de NO por macrófagos tratados con ECP y EAP (Figura 9B y C), siendo para ambas muestras superior al provocado por el LPS.

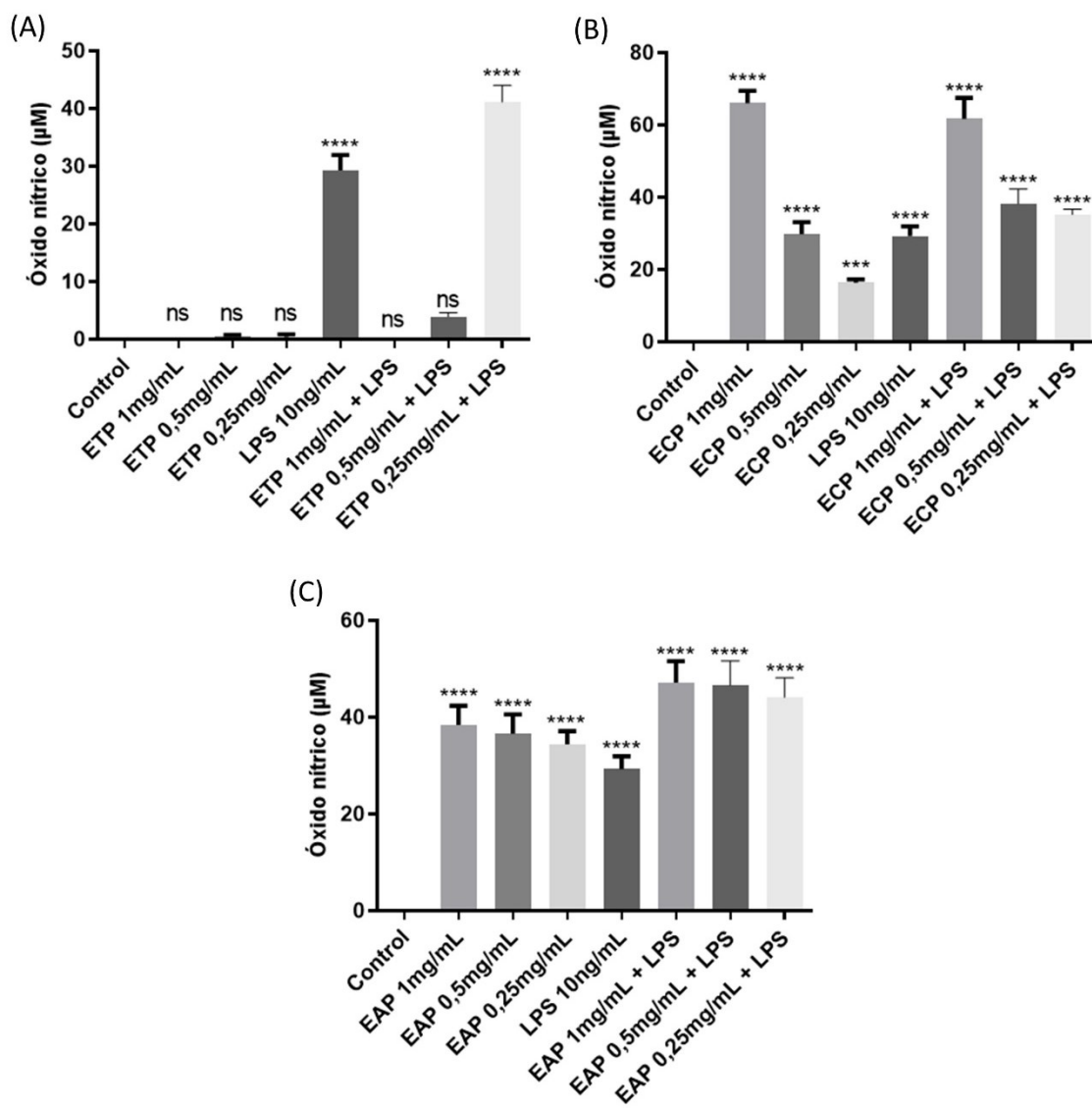


Figura 9. Niveles de óxido nítrico (NO, µM) en macrófagos RAW 264.7 tratados con **(A)** extracto del texturizado proteico de soja (ETP); **(B)** extracto del concentrado proteico de soja (ECP); y **(C)** extracto del aislado proteico de soja (EAP), en condiciones basales y condiciones de estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) a 10 ng/mL.

El mayor efecto fue provocado por ECP, cuyo tratamiento a la mayor concentración de 1 mg proteína/mL indujo un aumento de los niveles de NO hasta $66,05 \mu\text{M} \pm 3,36$. En el caso de EAP, los niveles de NO detectados fueron $38,37 \mu\text{M} \pm 4,01$, $36,57 \mu\text{M} \pm 4,02$ y $34,38 \mu\text{M} \pm 2,76$, a las concentraciones de 1, 0,5 y 0,25 mg proteína/mL, respectivamente.

Tras la estimulación de los macrófagos con LPS, ETP revertió el efecto estimulante, reduciendo el NO hasta niveles indetectables en el ensayo a las concentraciones de 1 y 0,5 mg proteína/mL. Sin embargo, a la concentración más baja ensayada, ETP no presentó ninguna actividad y el nivel de NO aumentó de forma significativa hasta $41,13 \mu\text{M} \pm 2,89$. De igual forma, los extractos ECP y EAP actuaron de forma sinérgica con el LPS aumentando los niveles de NO de forma dosis-dependiente y alcanzando valores de $61,71 \mu\text{M} \pm 5,79$ y $47,12 \mu\text{M} \pm 4,45$ en las células tratadas con 1 mg proteína/mL de ECP y EAP, respectivamente (Figuras 9B y C).

5. DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos empleado como muestras de partida tres productos comerciales de soja, un texturizado, un concentrado y un aislado proteico. A partir de dichos productos y mediante el empleo de un solvente acuoso, se pretendía un enriquecimiento de las proteínas y polipéptidos solubles, como son los inhibidores enzimáticos y el péptido lunasina, cuya presencia quería revelarse en las muestras evaluadas en este estudio. El PBS ha sido previamente empleado para la obtención de extractos enriquecidos en el péptido lunasina como paso previo a procesos más complejos de su purificación⁴⁰. Con el análisis de la concentración de proteína en las muestras de partida y los extractos fue posible evidenciar el mayor contenido de proteínas solubles presentes en AP, las cuales fueron extraídas por el PBS de manera más eficiente. Así, los extractos EAP presentaron un contenido en proteína superior al 35%, con un componente principal constituido por proteínas y polipéptidos de peso molecular mayor a 10 kDa, aunque se encontraron también presentes en EAP péptidos de tamaño intermedio (3 a 10 kDa) en una concentración de 3,10%. En dicha fracción, podría estar presente el péptido lunasina.

El análisis electroforético de los productos comerciales de soja y sus extractos reveló la presencia de proteínas descritas en la bibliografía como mayoritarias en la soja, como son las glicininas y las β -conglucininas⁸. Estas proteínas fueron también identificadas mediante el análisis proteómico de las muestras. Además, el análisis mediante HPLC-MS/MS permitió identificar otras proteínas presentes en menor grado en la soja, enzimas e inhibidores enzimáticos, como el inhibidor de tripsina y el KTI. Estos inhibidores han sido descritos como agentes protectores de la lunasina frente a la acción de las enzimas digestivas durante su tránsito por el tracto gastrointestinal⁴¹. El análisis proteómico también permitió identificar la albúmina 2S en cuya secuencia se encuentra el péptido lunasina. La cobertura de identificación fue superior en la muestra EAP, extracto procedente del aislado proteico, lo que podría definir este producto como prometedor para futuros procesos de enriquecimiento y purificación del péptido.

Con el objetivo de identificar la presencia de lunasina y determinar su concentración de manera semicuantitativa, se llevó a cabo un análisis mediante Western Blot, empleando un anticuerpo específico frente a la lunasina. Como se muestra en la Figura 8, la lunasina estaba presente en los tres tipos de productos de soja y en los extractos obtenidos a partir de ellos, aunque el mayor enriquecimiento del péptido se logró tras la obtención de EAP, debido al mayor contenido en proteínas solubles presentes en su muestra de partida, como se ha indicado anteriormente. Las concentraciones de lunasina obtenidas en este extracto fueron de 64,93 y 60,40 g de lunasina por g de proteína, superior a productos comerciales obtenidos a partir de soja y extractos enriquecidos en este péptido obtenidos a partir de harina de soja desengrasada⁴². Al igual que se había descrito previamente en la literatura⁴⁰, ambas formas monomérica y dimérica fueron observadas en las muestras del presente trabajo.

La lunasina ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, revelándose distintas propiedades bioactivas como la quimiopreventiva, antioxidante, anti-inflamatoria y moduladora del sistema nervioso e inmune³¹. Una vez identificada la presencia de lunasina en los extractos de muestras comerciales, se quiso evaluar la potencial contribución de este péptido a los posibles efectos antioxidantes e inmunomoduladores ejercidos por dichos extractos. Por lo tanto, la actividad antioxidante de las muestras, extractos y fracciones fue determinada, inicialmente, mediante dos métodos bioquímicos, el método ORAC que determina la capacidad neutralizante de radicales peróxido y el método ABTS que mide la capacidad neutralizante de radicales ABTS^{•+}. Estos ensayos han sido optimizados y ampliamente empleados como evaluación inicial de la actividad antioxidante de muestras de naturaleza peptídica^{39,43}.

La capacidad antioxidante de productos comerciales de texturizado proteico y aislado proteico había sido previamente determinada mediante el método ABTS en un estudio realizado con diferentes marcas de estos productos, obteniéndose valores para el texturizado proteico de 9,45 $\mu\text{mol ET/g}$ de producto y para el aislado proteico de 4,85 $\mu\text{mol ET/g}$ de producto⁴⁴. Para facilitar la comparación a los valores obtenidos en el presente trabajo, estos fueron convertidos a $\mu\text{mol ET/g}$ de producto, obteniéndose valores de 31,5 $\mu\text{mol ET/g}$ de producto para ETP y de 105,45 $\mu\text{mol ET/g}$ de producto para EAP, evidenciando el aumento en la actividad antioxidante tras la extracción con PBS respecto a los productos comerciales.

Los resultados reportados en la literatura para evaluar la actividad antioxidante son consistentes en indicar que las fracciones procedentes de distintas fuentes proteicas y correspondientes a péptidos de menor peso molecular tienen mayor actividad antioxidante^{45,46}. Los péptidos provenientes de alimentos que contienen entre 4 y 20 aminoácidos son los que presentan mayor capacidad de neutralización de los radicales peróxido⁴⁷. Los resultados observados en nuestras muestras (Tabla 6) de actividad antioxidante elevada tanto en ORAC como en ABTS pudieron ser atribuidos a la presencia de los péptidos bioactivos de peso molecular inferior a 10 kDa. Las fracciones ETP UF2 y EAP UF2, de contenido proteico entre 3 y 10 kDa han presentado valores ORAC de 2,40 y 2,88 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína, respectivamente. La lunasina y otros péptidos de pequeño y mediano tamaño pudieron contribuir en la alta actividad antioxidante de estas fracciones. La lunasina ha sido descrita como el primero péptido que contiene más de 20 aminoácidos con potente actividad antioxidante⁴⁸. En ensayo ORAC realizado con fracciones de peso molecular inferior a 10 kDa con hidrolizado producido a partir de aislado proteico de soja se han obtenido resultados similares a los obtenidos para ETP y EAP en este trabajo (Tabla 6), correspondientes a 2,37 μmol y 3,70 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína, sin y con empleo de tratamiento térmico, respectivamente, indicando que este podría potenciar los efectos antioxidantes de las muestras⁴⁹. En ABTS fueron observados resultados similares en muestras provenientes de efluentes industriales de la producción del concentrado proteico de soja sometidos a ultrafiltración secuencial de 50, 30 y 10 kDa, con valores de actividad antioxidante entre 0,63 y 1,24 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína, siguiendo la correlación de menor peso molecular y mayor actividad antioxidante, con la fracción menor a 10 kDa presentando mayor actividad. En esta misma tendencia, los mayores niveles de actividad antioxidante en nuestro trabajo se han presentado en fracciones de peso molecular inferior a 3 kDa, siendo la más alta atribuida a EAP con 6,43 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína en ORAC, indicando la presencia de péptidos pequeños con una capacidad antioxidante muy elevada, como lo previamente reportado por Ranamukhaarachchi y colaboradores⁴⁹ con el empleo de nanofiltración a 2,5 kDa, donde los resultados de actividad antioxidante por ORAC fueron de 5,70 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína sin empleo de calor y 5,20 $\mu\text{mol ET/mg}$ de proteína con empleo de calor, que en este caso parece afectar negativamente la bioactividad de estos péptidos.

Posteriormente, se quiso evaluar el efecto dosis-dependiente de los diferentes extractos en la producción de NO por parte de los macrófagos en condiciones basales y condiciones de estimulación mediante LPS. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados con macrófagos RAW 264.7 de inhibición en la producción de NO para la muestra ETP son consistentes con diferentes mecanismos antiinflamatorios reportados en la literatura con el mismo tipo de células, siendo este efecto atribuido a diferentes péptidos presentes en la soja y también a otros componentes, como las isoflavonas y gliceolinas^{50,51}, que estarían involucrados en la supresión de la vía del factor nuclear kappa B (NF-Kb). Los extractos ECP y EAP han presentado resultados divergentes, activando la producción de NO en los macrófagos estudiados (Figura 9B y C) en niveles incluso más elevados que los determinados tras la inducción con LPS. Estos resultados difieren de los obtenidos por Dia y colaboradores⁵², en los cuales se demostró la capacidad de la lunasina obtenida a partir de harina de soja desengrasada con pureza de 80% a una concentración de 10 μM como inhibidora de los niveles de NO en macrófagos. En nuestro estudio, se ha demostrado un

distinto comportamiento en función del origen y el tipo de muestra estudiada, por lo que sería interesante identificar los péptidos potencialmente responsables de los efectos observados, así como profundizar en el mecanismo de acción de dichos péptidos sobre otros biomarcadores asociados a la inflamación y/o la respuesta inmunitaria⁵³.

6. CONCLUSIONES

1. Mediante electroforesis en gel, análisis proteómico y Western Blot se reveló la presencia del péptido lunasina en las tres muestras comerciales procedentes de soja empleadas en este estudio, lográndose un enriquecimiento significativo en este péptido tras la extracción con un solvente acuoso (PBS) a partir de los extractos del aislado (EAP) y texturizado proteico (ETP). Estas muestras podrían considerarse como una fuente importante para la posterior purificación del péptido.
2. El extracto del texturizado proteico de soja (ETP) presentó la mayor capacidad neutralizante de radicales peroxilo y ABTS, seguido de los extractos del aislado (EAP) y del concentrado (ECP). Las fracciones conteniendo péptidos de tamaño intermedio (3-10 kDa) y pequeño tamaño (<3 kDa) fueron las principales responsables del efecto antioxidante observado.
3. En células en condiciones basales, el extracto ETP no produjo ningún efecto sobre los niveles de óxido nítrico (NO). Sin embargo, en células estimuladas, las mayores concentraciones de ETP ensayadas revertieron el efecto inductor del LPS hasta niveles indetectables de NO. Por otro lado, los extractos ECP y EAP provocaron un efecto inmunoestimulante sobre los macrófagos, incrementando los niveles de NO de forma significativa y dosis-dependiente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] FAO. Faostat: FAO Statistical Databases [Internet]. Rome, Italy: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2021 [citado el 11 de junio de 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#search/soybean>
- [2] Naresh S, Ong MK, Thiagarajah K, Muttiah NBSJ, Kunasundari B, Lye HS. Engineered soybean-based beverages and their impact on human health. En: *Non-Alcoholic Beverages*. Elsevier; 2019. p. 329–61.
- [3] Messina MJ. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(3 Suppl):439S-450S.
- [4] Fraanje W, Garnett T. Soy: food, feed, and land use change. Food Climate Research Network, University of Oxford. 2020.
- [5] Kinsella JE. Functional properties of soy proteins. *J Am Oil Chem Soc*. 1979;56(3Part1):242–58.
- [6] Featherstone S. Ingredients used in the preparation of canned foods. En: Featherstone S, editora. *A Complete Course in Canning and Related Processes*. Volume 2: Microbiology, Packaging, HACCP and ingredients. Sawston: Woodhead Publishing; 2015. p. 147–211.
- [7] Sugano M. Nutritional implications of soy. En: Sugano M, editor. *Soy in health and disease prevention*. Boca Raton, USA: CRC Press; 2006. p. 1-16.
- [8] Medic J, Atkinson C, Hurburgh CR. Current knowledge in soybean composition. *J Am Oil Chem Soc*. 2014;91(3):363–84.
- [9] Singer WM, Zhang B, Mian MAR, Huang H. Soybean amino acids in health, genetics, and evaluation. En: Sudarić A, editora. *Soybean for human consumption and animal feed*. London: Intech Open; 2020. p. 1-15.
- [10] Bøhn T, Cuhra M, Traavik T, Sanden M, Fagan J, Primicerio R. Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chem*. 2014;153:207–15.
- [11] Ibáñez MA, de Blas C, Cámara L, Mateos GG. Chemical composition, protein quality and nutritive value of commercial soybean meals produced from beans from different countries: A meta-analytical study. *Anim Feed Sci Technol*. 2020;267(114531):114531.
- [12] Messina M. Soy and health update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature. *Nutrients*. 2016;8(12):754.
- [13] Chatterjee C, Gleddie S, Xiao C-W. Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients*. 2018;10(9):1211.
- [14] Caponio GR, Wang DQ-H, Di Ciaula A, De Angelis M, Portincasa P. Regulation of cholesterol metabolism by bioactive components of soy proteins: Novel translational evidence. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):227.
- [15] Kobayashi H. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors. *Front Biosci*. 2013;5:966–73.
- [16] Panda PK, Mukhopadhyay S, Behera B, Bhol CS, Dey S, Das DN, et al. Antitumor effect

of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. *Life Sci.* 2014;111(1–2):27–35.

[17] Galvez AF, Revilleza MJR, de Lumen BO. Plant Gene Register, impreso PGR97-103; Genbank número de acceso de Gm2S-1 cDNA. AP005030. 1997.

[18] de Lumen BO, Galvez AF, Revilleza MJ, & Krenz DC. Molecular strategies to improve the nutritional quality of legume proteins. En: Shahidi F, Kolodziejczyk P, Whitaker JR, Munguia AL, & Fuller G, editores. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering, Advances in Experimental Medicine and Biology*, volume 464. Boston: Springer; 1999. p. 117-126.

[19] Alaswad AA, Krishnan HB. Immunological investigation for the presence of lunasin, a chemopreventive soybean peptide, in the seeds of diverse plants. *J Agric Food Chem.* 2016;64(14):2901–9.

[20] de Lumen BO, Galvez AF. Lunasin peptides. United States patent US 6544956 B1. 1997 sept 25.

[21] Hernández-Ledesma B, Hsieh C-C, de Lumen BO. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides.* 2009;30(2):426–30.

[22] Cavazos A, Morales E, Dia VP, De Mejia EG. Analysis of lunasin in commercial and pilot plant produced soybean products and an improved method of lunasin purification. *J Food Sci.* 2012;77(5):C539-45.

[23] Guijarro-Díez M, García MC, Crego AL, Marina ML. Off-line two dimensional isoelectrofocusing-liquid chromatography/mass spectrometry (time of flight) for the determination of the bioactive peptide lunasin. *J Chromatogr A.* 2014;1371:117–24.

[24] Ďůranová H, Fialková V, Bilčíková J, Lukáč N, & Křažická Z. Lunasin and its versatile health-promoting actions. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2019;8(4):1106.

[25] Fernández-Tomé S, Hernández-Ledesma B. Current state of art after twenty years of the discovery of bioactive peptide lunasin. *Food Res Int.* 2019;116:71–8.

[26] Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, de Lumen BO. Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *J Agric Food Chem.* 2007;55(3):632–7.

[27] Fernández-Tomé S, Sanchón J, Recio I, Hernández-Ledesma B. Transepithelial transport of lunasin and derived peptides: Inhibitory effects on the gastrointestinal cancer cells viability. *J Food Compost Anal.* 2018;68:101–10.

[28] Hsieh C-C, Hernández-Ledesma B, Jeong HJ, Park JH, de Lumen BO. Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *PLoS One.* 2010;5(1):e8890.

[29] Dia VP, Torres S, De Lumen BO, Erdman JW Jr, De Mejia EG. Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *J Agric Food Chem.* 2009;57(4):1260–6.

[30] de Mejia EG, Wang W, Dia VP. Lunasin, with an arginine-glycine-aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(3):406–14.

[31] Lule VK, Garg S, Pophaly SD, Hitesh, Tomar SK. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J Food Sci.* 2015;80(3):R485-94.

- [32] Hernández-Ledesma B, de Lumen BO, & Hsieh CC. 1997-2012: fifteen years of research on peptide lunasin. En: Hernández-Ledesma B, & Hsieh CC, editoras. *Bioactive food peptides in health and disease*. London, UK: InTech Open; 2013. p. 3-22.
- [33] Hsieh C-C, Martínez-Villaluenga C, de Lumen BO, Hernández-Ledesma B. Updating the research on the chemopreventive and therapeutic role of the peptide lunasin. *J Sci Food Agric*. 2018;98(6):2070–9.
- [34] Daliri EB-M, Oh DH, Lee BH. Bioactive peptides. *Foods*. 2017;6(5):32.
- [35] Kyle S, James KAR, McPherson MJ. Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microb Cell Fact*. 2012;11(1):28.
- [36] Setrerrahmane S, Zhang Y, Dai G, Lv J, Tan S. Efficient production of native lunasin with correct N-terminal processing by using the pH-induced self-cleavable Ssp DnaB mini-intein system in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;174(2):612–22.
- [37] Maubois JL, Lorient D. Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors. *Dairy Sci Technol*. 2016;96(1):15–25.
- [38] UniProtKB [Internet]. Uniprot.org. [citado el 12 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=proteome:UP000008827>
- [39] Hernández-Ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B, & Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2005;53(3):588-593.
- [40] Seber LE, Barnett BW, McConnell EJ, Hume SD, Cai J, Boles K, et al. Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS One* 2012;7(4):e35409.
- [41] Cruz-Huerta E, Fernández-Tomé S, Arques MC, Amigo L, Recio I, Clemente A, et al. The protective role of the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean lunasin digestion: the effect of released peptides on colon cancer growth. *Food Funct*. 2015;6(8):2626–35.
- [42] de Mejia EG, Castañeda-Reyes ED, Mojica L, Dia V, Wang H, Wang T, et al. Potential health benefits associated with lunasin concentration in dietary supplements and lunasin-enriched soy extract. *Nutrients*. 2021;13(5):1618.
- [43] Matemu A, Nakamura S, Katayama S. Health benefits of antioxidative peptides derived from legume proteins with a high amino acid score. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2):316.
- [44] Bolanho BC, & Beléia ADP. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. *Compostos bioativos e potencial antioxidante em derivados de soja. Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2012;22(4):539-546.
- [45] Ngoh Y-Y, Gan C-Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chem*. 2016;190:331–7.
- [46] Chen M, Li B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012;16:341–8.

- [47] Li Y-W, Li B. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key sequence positions and their amino acid properties. *J Theor Biol.* 2013;318:29–43.
- [48] García-Nebot MJ, Recio I, Hernández-Ledesma B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;65:155–61.
- [49] Ranamukhaarachchi S, Meissner L, Moresoli C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *J Memb Sci.* 2013;429:81–7.
- [50] Yi G, Li H, Liu M, Ying Z, Zhang J, & Liu X. Soybean protein-derived peptides inhibit inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPK-JNK and NF-kappa B activation. *J Food Biochem.* 2020;44(8):e13289.
- [51] Yoon E-K, Kim H-K, Cui S, Kim Y-H, Lee S-H. Soybean glyceollins mitigate inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression levels via suppression of the NF-κB signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2012;29(4):711–7.
- [52] Dia VP, Wang W, Oh VL, Lumen BO de, de Mejia EG. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* 2009;114(1):108–15.
- [53] Hernández-Ledesma B, Hsieh C-C, de Lumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):803–8.