



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOACTIVA SOBRE EL SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE PÉPTIDOS DE UN AISLADO DE PROTEÍNAS DE
AMARANTO LIBERADOS POR MECANISMOS HIDROLÍTICOS**

Para obtener el título de
Doctor en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana

PRESENTA:

M. en C. Alexis Ayala Niño

No. De cuenta
196506

Director:

DR. LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ OLIVARES

Co-directora:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRÍGUEZ SERRANO

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

ICSa-DCASH-Acta-Tit-2019
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Alexis Ayala Niño con número de cuenta 196506, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado “Evaluación de la capacidad bioactiva sobre el sistema cardiovascular de péptidos de un aislado de proteínas de amaranto liberados por mecanismos hidrolíticos”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 20 de junio de 2019. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ OLIVARES
 Director de tesis

DRA. GABRIELA MARIANA RODRÍGUEZ SERRANO

DR. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

ATENTAMENTE
 Pachuca, Hidalgo, 30 de julio del 2019
 “Amor, Orden y Progreso”

M.C.Esp. Adrián Moya Escalera
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud
 Dean



M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
 Jefa del Área Académica de Nutrición
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo
 Coordinadora de Posgrado del ICSa
 Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno
 Coordinadora del Programa Educativo
 Director of Graduate Studies

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	vi
Índice de Material Complementario	vi
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1 . Proteínas de Amaranto como fuente de péptidos bioactivos.	2
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1.1. Proteínas del amaranto.	4
1.2. Péptidos bioactivos.....	5
1.2.1. Digestión	6
1.2.2. Hidrólisis enzimática	7
1.2.3. Fermentación	7
1.3. Bioactividad de la proteína de amaranto.	9
1.3.1 Péptidos antihipertensivos.....	10
1.3.2 Péptidos antioxidantes	13
1.3.3 Antiinflamatorio	14
1.3.4 Antitumor.....	16
1.3.5 Otras bioactividades	17
Conclusión	18
Referencias	19
Capítulo 2 . Nuevas secuencias de péptidos multi-bioactivos liberados por digestión <i>in vitro</i> de proteínas de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	26
RESUMEN	26
ABSTRACT	26
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Muestra y tratamientos.....	28
Hidrólisis enzimática.....	28
Análisis de grupos amino libres mediante test de TNBS	28

Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico de glicina (SDS-PAGE de glicina)	28
Actividad antihipertensiva	29
Capacidad antitrombótica	29
Actividad antioxidante	30
Prueba ABTS	30
Prueba de DPPH	30
Prueba de FRAP	30
Identificación de péptidos	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Concentración de grupos de aminas libres	31
Actividad antihipertensiva y antitrombótica	33
Actividad antioxidante	34
Identificación de péptidos	35
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38
Capítulo 3. Bioactividad de péptidos liberados durante fermentación láctica de proteínas de amaranto con potencial efecto protector cardiovascular	40
RESUMEN	40
ABSTRACT	40
INTRODUCCIÓN	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
Extracción de proteína de amaranto	42
Fermentación de la proteína del amaranto	42
Cuantificación del Grado de hidrólisis por TNBS	43
Determinación de la bioactividad	43
Actividad antihipertensiva	43
Actividad antitrombótica	44
Actividad antioxidante	44
Análisis estadístico	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Actividad proteolítica	45
Estudios de bioactividad <i>in vitro</i>	47

Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina e inhibición de trombina.....	47
Actividad antioxidante.....	48
CONCLUSIONES.....	49
MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	50
REFERENCIAS	53
Capítulo 4 . Identificación de péptidos bioactivos derivados de proteínas hidrolizadas por un proceso enzimático de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>).....	55
RESUMEN	55
ABSTRACT	55
INTRODUCCIÓN	56
Metodología	57
Muestra y tratamientos.....	57
Hidrólisis enzimática.....	57
Capacidad proteolítica mediante la prueba de TNBS.....	57
Actividad antihipertensiva.....	58
Capacidad antitrombótica	58
Actividad antioxidante.....	59
ABTS.....	59
DPPH.....	59
FRAP.....	59
Aislamiento e identificación de péptidos bioactivos por RP-HPLC.	60
Preparación de la muestra.....	60
RP-HPLC	60
Espectrometría MALDI-TOF	60
Análisis estadístico	61
Resultados	61
Hidrólisis enzimática.....	61
Análisis de bioactividad de hidrolizados.....	61
Separación por RP-HPLC y bioactividad de fracciones.	62
Discusión	65
CONCLUSIONES.....	68
REFERENCIAS	70

Índice de Figuras

Figura 1.1. Secuencia amino acídica de Glibulina 11	5
Figura 1.2. Digestión <i>in vivo</i> de proteínas	6
Figura 1.3 Acción de exopeptidasas y endopeptidasas.....	7
Figura 1.4. Sistema Proteolítico de Lactobacilos	8
Figura 1.5. Posible actividad anti-inflamatoria de péptidos.....	15
Figura 2.1. Concentración de grupos amino libres y electroforesis de hidrolizados de proteína de amaranto por digestión (Std: Estándar; L1: Línea1 proteína de amaranto; L2: línea 2 hidrolizado con pepsina; L3: Línea 3 hidrolizado con pepsina-pancreatina).....	32
Figura 2.2. Inhibición de ECA y Trombina de hidrolizados de proteína de amaranto.	34
Figura 2.3. Actividad antioxidante por ABTS, DPPH y FRAP de proteína de amaranto hidrolizada por digestión <i>in vitro</i>	35
Figura 3.1. Concentración de grupos amino libres.	46

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Composición química y amino ácidos esenciales en el grano de amaranto.	4
Tabla 1.2. Métodos usados para liberar péptidos a partir de amaranto.	10
Tabla 2.1. Secuencias con actividad antitrombótica presentes en las proteínas de amaranto.	36
Tabla 3.1. Inhibición de ECA y Trombina.....	48
Tabla 3.2. Actividad antioxidante	49
Tabla 4.1. Bioactividad de hidrolizados obtenidos por hidrólisis enzimática de proteína de amaranto	62
Tabla 4.2. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina-I y Trombina (IC ₅₀ , mg/L) y actividad antioxidante (ABTS SC ₅₀ , mg/L) de fracciones de proteína de amaranto.	63
Tabla 4.3. Péptidos identificados en las fracciones más activas de hidrolizados de proteína de amaranto.	64

Índice de Material Complementario

Material complementario 4.1. Cuenta Viable durante fermentación de proteína de Amaranto.	50
Material complementario 4.2 Inhibición de trombina y Enzima Convertidora de Angiotensina durante la fermentación de proteína de amaranto.....	51
Material complementario 4.3 Actividad antioxidante durante fermentación de proteína de amaranto.	52

INTRODUCCIÓN

El amaranto es un alimento mexicano, ampliamente consumido. Este cuenta con un porcentaje de proteína de hasta el 19%, el cual es uno de los más altos comparado con otras semillas de su tipo. Aunque las proteínas de leche han sido la principal fuente de estudio en la obtención de péptidos bioactivos, muchos de ellos se han enfocado en buscar alternativas para la diversificación de fuentes proteicas de péptidos con actividad biológica. Es por ello que se consideró para el desarrollo de este trabajo, la liberación de péptidos con actividad biológica, principalmente aquellas relacionadas con un efecto sobre el sistema cardiovascular. Así es que se ensayaron actividades como la antihipertensiva, la antitrombótica y la antioxidante, las cuales ya se habían estudiado de manera independiente. Sin embargo, en esta ocasión se realizaron estudios de multiactividad biológica de fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis, por diferentes mecanismos, de proteínas de amaranto.

El reporte está presentado en cuatro capítulos, los cuales representan una publicación de cada uno de ellos. El capítulo 3 publicado en el Journal of Food Medicine, el capítulo 4 aceptado en Molecules y los capítulos 1 y 2 enviados al International Food Research International y al Canadian Journal of Plant Science.

En el capítulo uno se resumen los estudios alrededor de la liberación de péptidos bioactivos encriptados en cadenas polipeptídicas de proteínas de amaranto, así como de las generalidades del grano. En el capítulo dos, se reporta la evaluación de la hidrólisis por digestión *in vitro* utilizando pepsina y pancreatina de la proteína de amaranto, y la cuantificación de las multibioactividades con efecto al sistema cardiovascular. El capítulo tres, describe la bioactividad liberada durante la fermentación de proteína de amaranto por dos distintas bacterias, utilizando *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*, realizando fermentaciones por monocultivos y en combinación. Finalmente, en el capítulo cuatro se realizó la hidrólisis de la proteína, liberación, purificación y secuenciación de los péptidos obtenidos después de una hidrólisis enzimática con las enzimas alcalasa y flavourzyme, en forma individual o en secuencia.

Es así que se presenta este trabajo que representa un estudio integral de los mecanismos de hidrólisis de proteínas de una fuente alimentaria, muy consumida pero con pocos estudios.

Capítulo 1 . Proteínas de Amaranto como fuente de péptidos bioactivos.

RESUMEN

Recientemente, los péptidos bioactivos se han utilizado como alternativa para prevención de enfermedades o el tratamiento en combinación con medicamentos. Incluso cuando el alimento más estudiado ha sido la leche, se han investigado otras fuentes con el objetivo de diversificar las alternativas para la obtención de este tipo de péptidos. El amaranto es un cultivo americano, con un alto porcentaje de proteínas (> 15%); y se ha utilizado en varios estudios para liberar péptidos con diferentes bioactividades. El objetivo de este capítulo fue revisar el estado del arte en la generación de péptidos a partir de proteínas de amaranto. Se encontró que la hidrólisis por digestión *in vitro* es el proceso más común para la liberación de péptidos. Esta revisión se centra en el amaranto como un producto potencial para la obtención péptidos bioactivos.

Palabras clave: Amaranto, péptidos bioactivos, liberación de péptidos, proteína, proteólisis.

ABSTRACT

Bioactive peptides have been lately used as an alternative for the treatment or prevention of diseases. Even when the most studied food has been milk, different crops have been investigated with the aim of diversifying peptides alternatives. Amaranth is an American crop, with a high percentage of protein (>15%); and it has been used in several studies to release peptides with different bioactivities. The aim of this work was to review the state of the art in peptides generation from amaranth proteins. Finding that hydrolysis *in vitro* digestion is the most typical process for the release of peptides. This review focuses on amaranth as a potential product for obtaining bioactive peptides.

Keywords: Amaranth, bioactive peptides, peptides release, protein, proteolysis.

INTRODUCCIÓN

El amaranto es un alimento precolombino, distribuido principalmente en la región entre México y Chile. Se ha reportado que fue utilizado por civilizaciones como la Inca, la Azteca y la Maya, que la incluyeron como parte de su dieta. El amaranto se difundió lentamente en otras regiones geográficas, al grado que se llegó a encontrar en Europa como planta ornamental desde el siglo XVIII o bien en África y Asia como vegetal desde el siglo XIX, sin haber alcanzado la importancia en la nutrición humana como la tuvo en su región de origen (Borneo y Aguirre, 2008). Su distribución en diversas áreas geográficas se debe a su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, como los suelos de fertilidad media o baja y las condiciones de lluvia limitada (Amicarelli y col., 2002; Bressani 1993).

Esta planta pertenece a la orden Caryophyllales, a la familia Amaranthaceae y al género *Amaranthus*. Existen más de 60 géneros y 800 especies de amaranto en el mundo, la mayoría de ellas especies de malezas como *A. retroflexus*. Solo algunas especies se utilizan como alimento, vegetales de hoja, forraje y ornamentales, siendo *A. tricolor*, *A. blitum*, *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* las más comunes (Aguilar y col., 2011; Bressani 1993). El amaranto es una planta anual dicotiledónea y herbácea; puede alcanzar más de 3 m en un vástago vertical rígido. Las hojas de amaranto son de color verdoso y rojo, en su mayoría son comestibles. Cuenta con flores muy pequeñas de color púrpura, rojo oscuro o verde amarillo. Sus frutos contienen una semilla pequeña y lenticular (1.0-1.5 mm de diámetro; 0.6-1.2 g) que puede ser blanca, dorada, roja y oscura (Adhikary y Pratt 2015; Bressani 1993; Teutonico y Knorr, 1985).

Debido a sus características nutricionales no se considera un cereal (mayor concentración de proteína y la ausencia de gluten), es más bien un "pseudo-cereal", como el alforfón y la quinoa (Amicarelli y Camaggio 2012). La composición química del grano de amaranto es de especial interés (tabla 1.1). El grano entero se divide en tres partes, la capa (lisa, delgada y fácil de remover), el germen (rico en grasa), y el perispermo (rico en almidón). Debido a su cantidad y calidad en macronutrientes (mayor proporción en proteínas y grasas) se diferencia de los cereales tradicionales (Bressani 1993; Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012) Un hecho importante del amaranto es que esta semilla tiene una composición de aminoácidos esenciales equilibrada, similar a las directrices de la FAO/OMS para la dieta humana (Amicarelli y Camaggio 2012; Gobelnik-Mlakar y col., 2010; Rastogi y Shukla 2013).

	Por cada 100 g de grano		Por cada 100 g de proteína
Energía (kcal)	365-370	Trp	0.98-1.8
Proteína (g)	13.57-18.19	Met/Cys	4-4.9
Grasas total (g)	2.5-8.50	Thr	3.3-4
Carbohidratos (g)	60.54-66.25	Isl	2.7-4
Almidón (g)	57.27-68	Val	3.9-4.7
Fibra (g)	2.6- 6.7	Lys	5-6
		Phe/Tyr	5-8.5
		Leu	4.2-6.3

Tabla 1.1. Composición química y amino ácidos esenciales en el grano de amaranto.

Fuente: Elaboración personal con datos de los autores: Caselato-Sausa y Amaya-Farfán 2012; Becker y col., 1981; Grobelnik-Mlakar y col., 2010; Adhikary y Pratt 2015.

1.1. Proteínas del amaranto.

La mejor fuente de proteínas de alta calidad nutricional son las proteínas animales, sin embargo estas tienden a ser más costosas y algunas de ellas causan alergias o intolerancias (Shevkeni y col., 2013; Tavano y col., 2008). Por esta razón, existen estudios nutricionales que se centran en las proteínas vegetales (Zhang y col., 2018) como las de amaranto. Este grano cuenta con proteínas de alta calidad (cuenta con todos los aminoácidos esenciales) y altamente digeribles (13-19% de proteínas con 90% de digestibilidad), con un buen equilibrio en aminoácidos, mejor que los contenidos en cereales y legumbres; alto en lisina (deficiente en cereales) y también carece de proteínas que forman gluten (gliadina), lo que lo hace adecuado para su consumo en la dieta celíaca (Alencar y col., 2016; Kurek y col., 2018).

Las proteínas del grano de amaranto se dividen según su solubilidad en globulinas, albúminas y prolaminas (Barba de la Rosa y col., 1992). Silva-Sánchez y col., (2008) reportaron la presencia de las tres fracciones de proteína y más tarde, Montoya-Rodríguez y col., (2014) observaron las mismas proteínas incluso después del proceso de extrusión.

Globulina 11S o amarantina: es la principal fracción de las proteínas aisladas de amaranto (Quiróga y col., 2009). Fue caracterizada por primera vez por Barba de la Rosa y col., (1996), está formado por 501 aminoácidos (Figura 1.1) y tiene un peso molecular de 56 kDa. La globulina 11S es una de las proteínas de almacenamiento más importantes de la semilla (Condés y col., 2009), consta de 3 subunidades integradas en dos trimeros en un homohexámero (Carrasco-Peña y col.,

2013). El homohexámero se compone de monómeros entre 52 y 59 kDa que están unidos por un enlace SS (Jenssen y col., 2016).

```
STHASGFFFFHPTKMAKSTNYFLISCLLFVLFNGCMGEGRFREFQ
QGNECQIDRLTALEPTNRIQAERGLTEVWDSNEQEFRCAGVSV
IRRTIEPHGLLLPSFTSAPELIYIEQNGGITGMMIPGCPETYESGSQ
  QFQGGEDERIREQSRKFGMRGDRFQDQHQKIRHLREGDIFAM
PAGVSHWAYNNGDQPLVAVILIDTANHANQLDKNFPTRFYLA
GKPQQEHSGEHQFSRESRRGERNTGNIFRGFETRLLAESFGVSEEI
AQKLQAEQDDRGNIVRVQEGLVHVIKPPSRAWEEEREQSGRSRY
LPNGVEETICSARLAVNVDDPSKADVYTPPEAGRLTTVNSFNLP
LRHLRLSAAKGVLYRNAMMAPHYNLNAHNIMYCVRGRGRIQI
VNDQQQSVFDEELSRGQLVVVPQNFIVKQAFEDGFVWVSKFT
SENAMFQSLAGRTSAIRSLPIDVVSNIYQISREEAFGLKFNRPETT
LFRSSGQGEYRRKISIA
```

Figura 1.1. Secuencia aminoácida de Glibulina 11

Amino acid nomenclature: C, cys; cysteine; H, his; histidine; I, ile; isoleucine; M, met; methionine; S, ser; serine; V, val; valine; A, ala; alanine; G, gly; glycine; L, leu; leucine; P, pro; proline; T, thr; threonine; F, phe; phenylalanine; R, arg; arginine; Y, tyr; tyrosine; W, trp; tryptophane; D, asp; aspartic acid; N, asn; asparagine; B, asx; either of D or N; E, glu; glutamic acid; Q, gin; glutamine; Z, glx; either of E or Q; K, lys; lysine. Secuencia Proteínica de base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>)

Globulina 7S: está presente en el amaranto en menor cantidad que la globulina 11S, al mismo tiempo, ha sido menos estudiada (Tandang y col., 2010). Quiróga y col., (2010) encontraron que la globulina 7S está constituida por 4 subunidades de 66, 52, 38 y 16 kDa, con un peso molecular total de 200 kDa. García-González y col., (2013) reportaron la globulina 7S compuesta por 3 subunidades principales llamadas α (57-69 kDa), α' (57-72 kDa) y β (42-52 kDa), que están unidas por enlaces covalentes formados por un trímero con un peso molecular de entre 170 y 200 kDa.

Albuminas: en el amaranto se encuentra en grupos de 2 polipéptidos, llamados MRPs, con 16-18% de metionina y un peso molecular de 18 kDa (Segura-Nieto y col., 1994; Silva-Sánchez y col., 2004)

Prolaminas: esta es la proteína menos abundante en el amaranto (Segura-Nieto y col., 1992). Está formado por tres fracciones con peso molecular aparente entre 52-54, 33-34 y 22-27 kDa, unidas por enlaces disulfuro (Barba de la Rosa y col., 1992; Jenssen y col., 2017).

A partir de estas tres fracciones que conforman los principales componentes proteícos del amaranto se pueden liberar péptidos con diferentes bioactividades.

1.2. Péptidos bioactivos.

Los péptidos bioactivos se definen como fracciones de proteínas específicas con función fisiológica benéfica, por ejemplo en la disminución de la presión arterial o bien con un efecto opioide

antagonista o agonista. Otras bioactividades importantes que pueden presentar estos péptidos son la antitrombótica, antimicrobiana, hipocolesterolémica, antioxidante, entre otras (Lorenzo y col., 2018). En algunos casos, los péptidos encriptados en secuencias de proteínas pueden presentar actividad multifuncional. Sin embargo, mientras estos se encuentran unidos a la proteína, su actividad es nula. Dichas secuencias bioactivas pueden liberarse mediante tres métodos diferentes: durante la digestión en el tracto digestivo, por acción enzimática y por fermentación microbiana (Hartman y Meisel 2003; Kitts y Weiler 2003).

1.2.1. Digestión

El proceso enzimático *in vivo* (Figura 1.2) o *in vitro* es la forma más común de producir péptidos bioactivos. Durante este proceso, la proteína se hidroliza completamente, con la combinación de enzimas pepsina-pancreatina y pepsina-tripsina, reportadas como las más utilizadas en estudios *in vitro*. Con este proceso enzimático, se han liberado péptidos con diferentes actividades biológicas en alimentos como la leche, el huevo y la soja (Capriotti y col., 2015; Grootaert y col., 2017; Su y col., 2017). Por otro lado, se han identificado péptidos con actividad antitrombótica en la sangre de los lactantes después del consumo de leche materna (Chabance y col., 1995) y péptidos antihipertensivos en plasma de adultos después del consumo de sardina (VY) y yogur (LPP, VPP y IPP).) (Foltz y col., 2007; Matsui y col., 2002). Incluso cuando los estudios *in vitro* son accesibles y pueden proporcionar un buen enfoque para los estudios *in vivo*, se han realizado estudios comparativos en leche en ambos sistemas, lo que ha demostrado la generación de una gran cantidad de péptidos y aminoácidos tanto *in vivo* como *in vitro* (Egger y col., 2017; Sanchón y col., 2018).

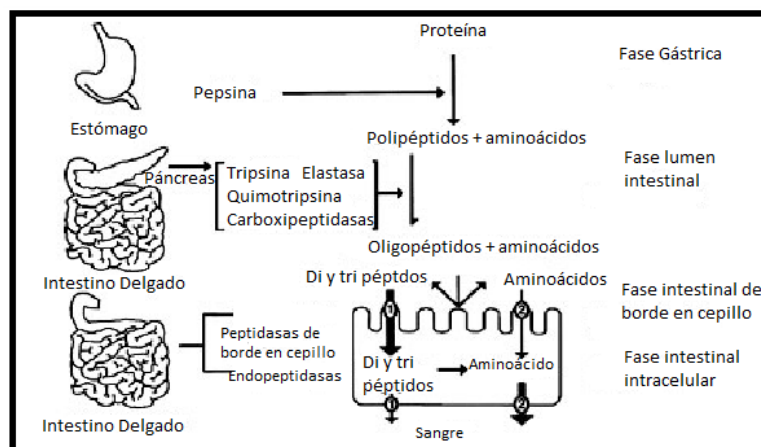


Figura 1.2. Digestión *in vivo* de proteínas

1.2.2. Hidrólisis enzimática

Las proteinasas y peptidasas extraídas de plantas, bacterias, hongos y animales se han aplicado para liberar péptidos con este método (Figura 1.3). Por ejemplo, Suh y col., (1999) encontraron péptidos con inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE-i) con el uso de Pescalase (Serin proteasa de *Bacillus licheniformis*) en proteínas de maíz; y Zarei y col., (2014) liberaron péptidos antioxidantes de desechos de palma usando papaína. También se han identificado péptidos antioxidantes después del uso de Alcalasa (proteinasa de *Bacillus subtilis*) y Flavourzyme (peptidasas de *Aspergillus oryzae*) en maíz y linaza, respectivamente (Silva y col., 2017; Zhuang y col., 2013). También se ha reportado la liberación de péptidos antibacterianos y reductores del colesterol al usar ambas enzimas en un proceso continuo sobre proteínas de chía (Coelho y col., 2018).

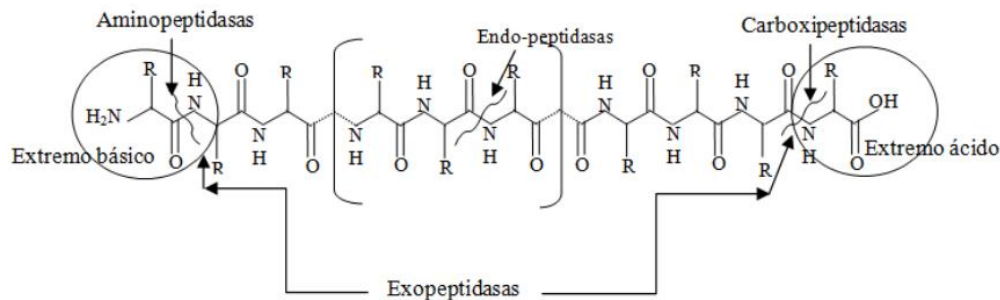


Figura 1.3 Acción de exopeptidasas y endopeptidasas.
(Modificada de Cremonesi, 2002)

1.2.3. Fermentación

Los péptidos bioactivos pueden producirse, utilizando bacterias iniciadoras, a partir de productos lácteos. El sistema proteolítico de estos microorganismos permite liberar péptidos encriptados en secuencias proteínicas. Este sistema se divide en tres pasos principales (Figura 1.4); el primero consiste en la acción de una proteinasa unida a la pared celular, luego los oligo, tri- y di- péptidos formados por la proteinasa se transportan al interior de la bacteria, donde finalmente se dividen nuevamente por endo, amino, tri y dipeptidasas (Savijoki y col., 2006). Este método para la obtención de péptidos bioactivos se ha utilizado en proteínas de diferente naturaleza, como la leche, la carne, la soja, el tomate, el guisante, entre otros, liberando péptidos con múltiples actividades como la ECA-I, antioxidantes y antimicrobianos, con el uso de monocultivos o la combinación de diferentes especies (Aguilar-Toalá y col., 2017; Daleri y col., 2018; Gallego y col., 2018; Mechmeche y col., 2017 Vermeirssen y col., 2003). A pesar de que el sistema proteolítico de estreptococos y lactobacilos cuenta con los mismos tres pasos, tienen pequeñas diferencias

(Rodríguez-Serrano y col., 2018). Estas diferencias se deben a necesidades peptídicas específicas para cada microorganismo, por ejemplo, los estreptococos cuentan con peptidasas específicas para aminoácidos aromáticos, los cuales son esenciales para su desarrollo (Zhang y col., 2011). En la figura 3 se ilustra el sistema proteolítico de lactobacilos.

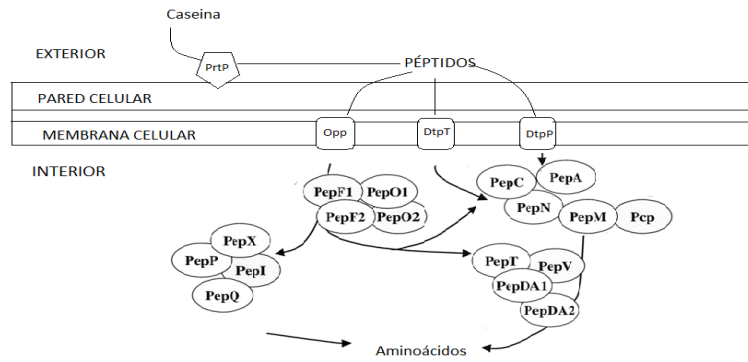


Figura 1.4. Sistema Proteolítico de Lactobacilos
(Modificado de Guédon y col., 2001)

- a) **Proteinasa.** La proteinasa se encuentra unida a la pared celular y es llamada PrtP en el caso de lactobacilos y PrtS para estreptococo (Chang y col., 2014). La principal diferencia es que la PrtS se encuentra anclada a la membrana celular por medio de una sortasa (SrtA) (Chang y col., 2012). También, la actividad proteolítica de PrtS es mayor que PrtP, esto debido a que los estreptococos tienen mayor necesidad de ácido glutámico y metionina. La proteinasa del estreptococo se activa en caso de que las concentraciones de estos aminoácidos sean inadecuadas (Letort y Jullard 2001).
- b) **Transporte membranal.** Esta fase cuenta con distintos transportadores específicos. Lactobacilos cuenta con al menos 10 distintos transportadores de aminoácidos con alta especificidad y diferentes sistemas de regulación, por ejemplo: Glu/Gln, Asn y Pro/Gly se regulan por ATP (Poolman y col., 1995), mientras que los transportadores de di y tri péptidos hidrofílicos como Leu/Val/Ile y Ala/Gly y Ser/Thr son transportados por intercambio de protones (Savijoki y col., 2006). En el caso de estreptococos, la hidrólisis trabaja con un sistema de energía externo, esto debido a que no cuenta con una fuente de energía endógena (Akpemado y col., 1983). Estas bacterias poseen dos sistemas básicos de energía, el primero es por ATP o metabolitos de ATP. El segundo es por la formación de un protón que genera la fuerza que acompañará el transporte de aminoácidos y péptidos de cadena corta. El transporte de aminoácidos dependerá de las condiciones de temperatura y pH óptimas para cada microorganismo (Heefner y Harold, 1982).

En el caso de transporte oligopéptidos en lactobacilos, consiste en 5 proteínas (OppA, B, C, D y F), que pertenecen a la familia de las ABC, que son ATP-dependientes y son capaces de transportar hasta 12 aminoácidos (Lamarque y col., 2004). En contraste, el transporte de oligopéptidos en estreptococos es considerado un sistema más complejo, debido a que permite la entrada de cadenas de hasta 23 aminoácidos mediante el sistema Ami (Jullie y col., 2005). En este sistema, ATP-dependiente, está asociado con la membrana celular, el cual es responsable de la activación de operones (AmiA1, AmiA2 y AmiA3) (Garault y col., 2002). Estos operones se pueden activar por la presencia de aminoácidos sulfurados, los cuales promueven un cambio en las proteínas a su conformación de α -hélice, para permitir la entrada de hasta 23 aminoácidos. Los ATP's requeridos son donados por los operones Ami, AmiE y AmiF (Hols y col., 2005).

c) Peptidasas. Una vez que los péptidos son transportados al interior del microorganismo, son fraccionados para liberar los aminoácidos esenciales. Esta acción es desarrollada por un sistema de peptidasas y aminopeptidasas intracelulares. En general se han encontrado diecisiete peptidasas en lactobacilos y catorce en estreptococos, y cabe señalar que aunque tienen los mismos nombres en ambos microorganismos, PepN, PepC, PepS, PepX y PepO, en los estreptococos tienen características y actividad diferentes a aquellas encontradas en *Lactobacillus* (Rul y Monnet, 1997).

La efectividad de los péptidos bioactivos depende de dos factores, su resistencia a la degradación gastrointestinal por las peptidasas y su absorción en el torrente sanguíneo. Esto depende a su vez de los transportadores de péptidos (PEPT1 para tripéptidos; pinocitosis para péptidos solubles; paracelular para transporte acuoso y rutas transcelulares). Estos dos factores afectan la secuencia de aminoácidos, en consecuencia las bioactividades y los resultados clínicos podrían modificarse (Aluko, 2015).

1.3. Bioactividad de la proteína de amaranto.

El amaranto es un alimento rico en proteínas (> 15%), lo que lo convierte en una buena fuente para la liberación de péptidos bioactivos con diferentes actividades. La tabla 1.2 resume los métodos a través de los cuales se han liberado péptidos bioactivos de amaranto.

Tabla 1.2. Métodos usados para liberar péptidos a partir de amaranto.

Método	Bioactividad	Referencia
Digestión <i>in vitro</i>	Antioxidante	Orsini-Delgado y col., 2016, Orsini-Delgado y col., 2015, Orsini-Delgado y col., 2011
	Antihipertensiva	Tiengo y col., 2009
	Antihipertensiva	Quiroga y col., 2011, Barba de la Rosa y col., 2010
	Antiinflamatoria	Montoya-Rodríguez y col., 2014, Moronta y col., 2016, Montoya-Rodríguez y González-Mejía 2015
Digestión <i>in vivo</i>	Antitrombótica	Sabbione y col., 2016
	Inhibición de Dipeptidil peptidasa IV	Velarde-Slacedo y col., 2012
Hidrólisis enzimática	Hipocolesteromiante	Mendonça y col., 2009 Soares y col., 2015
	Antioxidante	Torini y Añón 2010
	Antihipertensiva	Fritz y col. 2011
	Antihipertensiva	Tovar-Pérez y col., 2009
	Antiinflamatoria	Moronta, Smaldini y col., 2016
	Antitrombótica	Sabbione, y col., 2015
Identificación y aislamiento de proteína bioactiva	Inhibición de Dipeptidil peptidasa IV	Soriano-Santos y col., 2015
	Antitumoral	Barrio y Añón 2010, Quiroga y col., 2015
	Antitumoral	Sani y col., 2004
	Antitumoral	Maldonado-Cervantes y col., 2010
	Antihipertensiva	Luna-Suárez y col., 2010.
	Antimicrobiano	Broekaert y col., 1992, Lipkin y col., 2005
<i>In silico</i>	Insecticida	Valdes-Rodríguez y col., 1993. Chagolla-López y col., 1994
	Antihipertensiva	Vicchi y Añón 2009
Proteínas de amaranto diseñadas	Antihipertensiva	Medina-Godoy y col., 2013
Extrusión	Antiinflamatoria	Montoya-Rodríguez y col., 2014

1.3.1 Péptidos antihipertensivos

La hipertensión es un problema de salud pública en todo el mundo, con una prevalencia del 30%. El uso de medicamentos convencionales tiene efectos secundarios típicos, es por eso que el uso de nutracéuticos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares podría hipotéticamente suponer un ahorro económico para el sector salud y una beneficio en la no manifestación de efectos secundarios (Borgui y col., 2016). En ello se basa la importancia en el estudio de la liberación de péptidos con actividad antihipertensiva de diferentes matrices alimentarias.

La actividad antihipertensiva de los péptidos es una de las bioactividades más estudiadas. Investigadores los han buscado en diferentes fuentes, como el pescado, la leche, la carne y las proteínas de origen vegetal (Ciau-Soli y col., 2017; Simonetti y col., 2017; Yathisha y col., 2018; Zuhaib y col., 2017). La leche ha sido la fuente de proteínas más estudiada para la producción de los péptidos antihipertensivos. De esta fuente se han encontrado los tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, con una alta actividad antihipertensiva con dosis entre 5 y 100 mg/día (Cicero y col., 2016).

La primera evidencia de péptidos antihipertensivos obtenidos de la proteína de amaranto fue reportado por Vecchi y Añón (2009). En este estudio *in silico*, la proteína globulina 11S fue mapeada con la ayuda de bases de datos de péptidos antihipertensivos, lo que permitió detectar dos tripéptidos (IKP y LEP), con una IC_{50} de la ECA de 6.32 mM y 175 μ M, respectivamente. Este fue el primer reporte que demostró que la proteína amaranto es una fuente de péptidos antihipertensivos. A partir de estos resultados, se realizaron los hidrolizados de los aislados proteicos enteros del amaranto y sus proteínas aisladas, como la albúmina, la glutelina y la globulina 11S y 7S.

La globulina y la albúmina fueron hidrolizadas con alcalasa, las fracciones obtenidas presentaron bajo peso molecular (550 Da de albúmina; 400 Da de globulina) con una IC_{50} de 636 μ M y 375 μ M, respectivamente. También reportaron que una hidrólisis más extensa, disminuía la actividad inhibitoria de la ECA (Soriano-Santos 2015; Tovar-Pérez y col., 2009). Aun así, se ha demostrado que la digestión gastrointestinal simulada a partir de hidrolizados de proteína de amaranto con alcalasa no altera significativamente la actividad inhibitoria de la ECA, ya que tiene más del doble de actividad cuando se hidroliza primero con alcalasa, que solo por digestión gastrointestinal. Tiengo y col., (2009) concluyeron que los hidrolizados de la proteína amaranto pueden ser una buena opción como producto hipotensor.

Cabe aclarar que la actividad antihipertensiva puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos; el más común es la inhibición competitiva y/o no competitiva de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Sin embargo, otros mecanismos de acción están relacionados con el aumento de la tensión arterial como la actividad de los agentes vasodilatadores, por ejemplo el óxido nítrico (NO) endotelial, la inhibición de la renina o la reducción del sistema simpático, que induce la vasodilatación (Aluko, 2005).

La inducción de la producción de NO durante la inhibición de la ECA ha sido evaluada en proteínas de amaranto. Se ha demostrado que la hidrólisis trípica de glutelina induce la producción de ON endotelial y la vasodilatación, con un IC_{50} de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; explicando por primera vez la asociación específica de péptidos de amaranto en la fisiología vascular (Barba de la Rosa y col., 2010). Por otro lado, la globulina 7S es un componente menor en el amaranto; Quiroga y col., (2011) compararon sus propiedades con la globulina 11S. En este estudio, se demostró que la globulina 7S puede desnaturalizarse a una temperatura más baja, tiene propiedades emulsionantes más altas y mayor solubilidad en un tampón neutro, lo que lo hace más adecuado para los usos alimentarios. Mediante un análisis bioinformático, encontraron que se liberan secuencias peptídicas antihipertensivas después de su digestión gastrointestinal con un IC_{50} de 0.17g/L.

Como lo demostró Tovar-Pérez y col., (2009), la alcalasa es una enzima adecuada para la liberación de péptidos antihipertensivos. Fritz y col., (2011) compararon la acción de diferentes enzimas, como la papaína, tripsina, quimotripsina y alcalasa; sus resultados demostraron *in vitro* que la mejor enzima para la liberación de péptidos antihipertensivos era alcalasa, con un efecto dosis dependiente en ratas espontáneamente hipertensas con IC_{50} de 0.12 mg/mL. Mientras tanto, los resultados de Lado y col., (2015) no registraron cambios en la presión arterial cuando las ratas se alimentaron con proteínas aisladas no hidrolizadas.

Una forma novedosa de obtener péptidos bioactivos es mediante la modificación de moléculas conocidas, para obtener diversas actividades. En este sentido, la globulina 11S o amarantina fue modificada para la obtención de una mayor actividad antihipertensiva, debido a que sus propiedades fisicoquímicas en la subunidad ácida la hacen susceptible a modificaciones. Para mejorar su actividad antihipertensiva, se realizó la inserción de cuatro péptidos antihipertensivos Val-Tyr e Ile-Pro-Pro en la estructura primaria en la tercera región variable de la globulina 11S. El experimento se llevó a cabo a través de un plásmido expresado en *Escherichia coli* Origami, la cual fue llamada AMC3. Una vez que la proteína fue expresada y purificada, ésta fue hidrolizada por digestión *in vitro* para comprobar la liberación de los péptidos insertados, lo que resultó en un aumento de la actividad en ocho veces más que en la proteína no modificada (IC_{50} 0.064 mg / mL) (Castro-Martínez et al., 2012; Luna-Suárez y col., 2010; Morales-Camacho y col., 2016). Al realizar estudios *in vivo*, los efectos positivos se observaron en ratas hipertensas espontáneas, el grupo que ingirió una dosis de 100 mg/kg de AMC3 previamente hidrolizado (digestión *in vitro*) tuvo efectos similares a los grupos tratados con captopril (Medina-Godoy y col., 2013).

1.3.2 Péptidos antioxidantes

La capacidad antioxidante en los péptidos se ha relacionado con la enzima utilizada para liberarlos, la naturaleza de la proteína, la estructura del péptido, su peso molecular, su hidrofobicidad y así como su composición de aminoácidos (Pihlanto 2006; Udenigwe y Aluko, 2012). Los mecanismos exactos de cómo funcionan los péptidos antioxidantes no están totalmente esclarecidos. Algunos estudios han demostrado su capacidad para inhibir la lipoperoxidación, para eliminar los radicales libres, para quelar iones metálicos o para evitar el daño oxidativo mediante la inducción de genes que codifican la producción de enzimas endógenas (Sarmadi e Ismail, 2010; Udenigwe y Aluko, 2012). Por ejemplo, Chen y col., (1996) postularon que la histidina, debido a la posición de sus grupos imidazol, se identifica como un donador importante de hidrógeno, eliminador de radicales peroxilo y quelante de metales mientras que los aminoácidos hidrófobos aumentan la accesibilidad de los antioxidantes a objetivos celulares como lo son las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, el triptófano, la tirosina y la fenilalanina se caracterizan por su capacidad para donar protones a radicales libres y quelar iones metálicos, mientras que la cisteína y la metionina, debido a sus grupos SH, también pueden eliminar radicales (David-Birman y col., 2018; Liang y Kitts, 2014). La importancia de la capacidad antioxidante radica en la prevención o el retraso en la oxidación de biomoléculas, la prevención del daño celular y enfermedades relacionadas al mantener los componentes celulares en estado reducido (Tohma y col., 2017).

El amaranto es un cultivo que contiene diferentes compuestos antioxidantes, como β caroteno, vitamina C, polifenoles, flavonoides y ácidos grasos (Pieretti y col., 2017; Sarker y col., 2017). También su alta concentración en proteínas puede contribuir al aumento de la actividad antioxidante mediante su hidrólisis. El principal método hidrolítico utilizado para la liberación de péptidos antioxidantes en el amaranto ha sido la digestión gastrointestinal simulada (Orsini-Delgado y col., 2011; 2015; 2016). Se ha observado que por la hidrólisis de las proteínas del amaranto, existe un aumento en los péptidos solubles, los cuales podrían ser responsables de las capacidades antioxidantes. Para la medición de la capacidad antioxidante, siempre se ha observado una actividad dosis dependiente, mostrando valores de IC_{50} más altos que los de Trolox (antioxidante conocido usado como control positivo). Se midió la mezcla de especies con diferente potencia antioxidante, incluidas las moléculas prooxidantes y otras con alta capacidad antioxidante (Orsini-Delgado y col., 2011). Incluso cuando la hidrólisis gastrointestinal simulada tenía la capacidad de aumentar la capacidad antioxidante, se realizó una hidrólisis previa con alcalasa, debido a que estudios realizados por Soriano-Santos y Escalona-Buendía (2015) y Torini y

Añon (2010) sugirieron que esta enzima tiene la capacidad para mejorar el contenido en péptidos antioxidantes, al liberar fracciones con un tamaño molecular inferior a 0.5 kDa con hasta un 66% de actividad inhibitoria de radicales. Cuando se agregó una hidrólisis con alcalasa a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, no se observaron cambios en la actividad antioxidante de los péptidos producidos (Orsini-Delgado y col., 2015). No obstante, se lograron caracterizar cuatro péptidos: AWEEREQGSR ($IC_{50} = 6.7 \mu\text{g} / \text{mL}$), YLAGKPQQEHH ($IC_{50} = 16 \mu\text{g} / \text{mL}$), IYIEQNGGITGM ($IC_{50} = 71 \mu\text{g} / \text{mL}$) y TEVWDSNEQ ($IC_{50} = 20 \mu\text{g} / \text{mL}$).

Se ha demostrado que la presencia de residuos de His y Pro es esencial para tener efecto antioxidante, lo que sugiere que los residuos de aminoácidos específicos en las cadenas de péptidos desempeñan un papel importante en la actividad antioxidante (Tang-Bin y col., 2016).

1.3.3 Antiinflamatorio

La inflamación, que puede ser aguda o crónica, es la respuesta del huésped a la invasión de sustancias extrañas y/o estímulos inflamatorios producidos por diferentes mediadores inflamatorios como los eicosanoides, las aminas vasoactivas, las citoquinas y la quimiocina (Serhan y Savill, 2005). Incluso cuando los eventos inflamatorios agudos están bien descritos, la inflamación crónica, particularmente en las infecciones crónicas y las enfermedades autoinmunes, no se conocen completamente (Laveti y col., 2013). La inflamación crónica está relacionada con una amplia variedad de enfermedades, como son el asma, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, el Parkinson, etc., que se asocian con un mal funcionamiento del tejido (Scriver y col., 2011). Debido a la relación entre la inflamación crónica y las enfermedades crónicas, estudios recientes se centran en el desarrollo de péptidos bioactivos con acción antiinflamatoria basada en células de mamíferos cultivadas (especialmente macrófagos) e inflamación químicamente inducida en modelos animales (Majumder y col., 2016) . Los péptidos derivados de fuentes alimenticias como la leche, los insectos comestibles, los huevos y la soja se han analizado para detectar posibles efectos antiinflamatorios beneficiosos (Lin y col., 2017; Meram y Wu, 2017; Zielinska y col., 2017). En la figura 2 se describen los efectos antiinflamatorios que pueden tener los péptidos bioactivos.

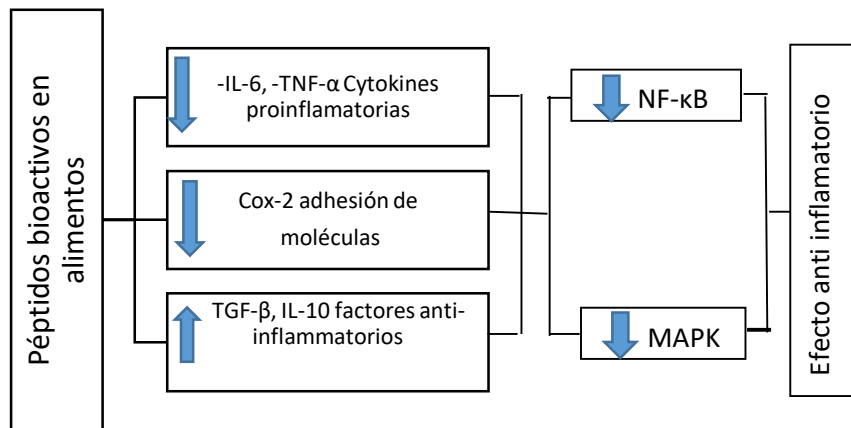


Figura 1.5. Posible actividad anti-inflamatoria de péptidos.

Péptidos bioactivos en alimentos pueden mediar el Factor Nuclear- κ B (NF- κ B) y la Protein quinasa Mitogen-Activado (MAPK), modificando citoquinas IL-6, -TNF- α , quimoquinas y adhesión de moléculas.

En estudios recientes, se ha investigado al amaranto en busca de péptidos con efecto antiinflamatorio, sometiéndolos a diferentes procesos y evaluando diversas respuestas antiinflamatorias. La primera evidencia de péptidos antiinflamatorios se observó después de la extrusión de la harina de amaranto (Montoya-Rodríguez y col., 2014 a). Se observó que la harina de amaranto después de procesarse y pasar a través de una digestión in vitro, mejoró el aumento de la actividad antiinflamatoria en diferentes biomarcadores, con tres péptidos. Los péptidos identificados fueron HGSEPFGPR, RPRPWRYT y RDGPFPPWYSH; donde el primer péptido mostró una mayor reducción en el receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas 1 (83%) y en la matriz metaloproteínasa-9 (52%); mientras que el segundo péptido identificado tuvo una mayor disminución en las moléculas de adhesión intracelular-1 (39%). Como resultado de estos estudios, se concluyó que la extrusión es una tecnología que libera péptidos con efectos antiinflamatorios, mejorando directamente los biomarcadores en aterosclerosis como lo es la disminución de la proteína C reactiva (PCR) e interleucinas (Montoya-Rodríguez y col., 2014a; 2014b; Montoya-Rodríguez y González de Mejía 2015).

Por otro lado, también se ha probado la hidrólisis de la proteína de amaranto con alcalasa para la liberación de péptidos con esta bioactividad. Con este método hidrolítico, se observó que un grado de hidrólisis de 23-30% era ideal para la liberación de péptidos antiinflamatorios capaces de

reducir la expresión de citoquina CCL20 a través de la activación de la ruta NF- κ B en células epiteliales colónicas. El péptido responsable de dicha actividad se identificó como SSEDIKE, el cual también demostró no ser tóxico e inhibir las reacciones alérgicas en modelo de ratón, con la supresión de la secreción de IgE y el control de la inflamación intestinal (Moronta y col., 2016a; 2016b). Con los resultados obtenidos en estos estudios se puede demostrar que, mediante diferentes métodos, es posible liberar distintas estructuras peptídicas a partir de la misma matriz, con posibilidades para la liberación de péptidos bioactivos con diferentes bioactividades.

1.3.4 Antitumor

Los estudios de proteínas y péptidos con potencial anticancerígeno son una estrategia innovadora para la prevención y tratamiento de cáncer (Chalamaiah y col., 2018; Freitas y col., 2019; Gaspar y col., 2013). Poseen ventajas como bajo costo, alta afinidad y fuerte especificidad para los tejidos diana, baja toxicidad y menos efectos secundarios adversos (Bhutia y Maiti 2008; Silva-Sánchez y col., 2008). Los péptidos antitumorales actúan en diferentes etapas del cáncer, como la iniciación, la promoción y la progresión (de Mejía y Dia 2010), con un efecto directo en la reducción de la progresión del tumor a través de múltiples mecanismos, incluidas las actividades apoptóticas, bloqueadoras de funciones, antiangiogénicas e inmunomoduladoras (Bhutia y Maiti 2008; Hernández-Ledesma y Chia-Chien 2017). Incluso cuando se ha evaluado una alta actividad anticancerígena en hidrolizados de proteínas (Ayyash y col., 2018; González-Montoya y col., 2018), lectinas y lunasinas de plantas, que son glicoproteínas de origen no inmune distribuidas en semillas, raíces, tallos y hojas, se ha demostrado una alta actividad antitumoral, tal es el caso de la soja y el amaranto (González de Mejía y col., 2003; Moreira y col., 1991).

En el amaranto se encontró que la lunasina está presente en todas las fracciones de la proteína del amaranto (albúmina, globulinas y prolaminas), con una mayor concentración en la gluteína del amaranto con 2,71 a 3,01 μ g equivalentes de lunasina/g de proteína (Maldonado-Cervantes et al., 2010; Silva -Sánchez et al., 2008). La lunasina es un péptido con 43 aminoácidos, su extremo carboxilo contiene nueve residuos de Asp (D), una secuencia de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) y una hélice con homología estructural con proteínas de unión a la cromatina (De Lumen, 2005). Se han demostrado propiedades preventivas de cáncer en modelos de cultivos celulares de mamíferos y en modelos en ratón con cáncer de piel por carcinógenos químicos, oncógenos e inactivadores de proteínas supresoras de tumores (De Lumen, 2005). Este tipo de péptidos se han encontrado en soja, cebada y trigo (González de Mejía y col., 2004; Jeong y col., 2002; Jeong y col., 2007).

La administración de lunasina de amaranto en células de mamíferos mostró una penetración del núcleo más rápida que la reportada para la lunasina de soja, y mostró 38.8% de apoptosis en células HeLa, 5.0% en células de fibroblastos con una concentración de glutelina de 5 µg/mL e inhibición de la acetilación de histonas para inhibir la transformación de las células NIH-3T3 en focos cancerosos (Maldonado-Cervantes y col., 2010; Silva-Sánchez y col., 2008). También los hidrolizados de la proteína amaranto con alcalasa y tripsina, han mostrado actividad antitumoral, en los péptidos diferentes a la lunasina, mostrando también actividad antiproliferativa contra las células MC3T3E1, UMR106, Caco-2 y TC7 (Barrio y Añón 2010; Quiroga y col., 2015; Silva-Sánchez y col., 2008).

1.3.5 Otras bioactividades

Como se mencionó, existen múltiples bioactividades que los péptidos pueden tener con efecto sobre el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. En el amaranto, se han encontrado péptidos antitrombóticos en sus hidrolizados con alcalasa y tripsina, o digestión *in vitro* con tripsina y pancreatina. En ambos estudios, se observó un aumento en la inhibición de la coagulación, con mayor bioactividad en los hidrolizados de glutelina y en fracciones con un peso molecular inferior a 4 kDa, que tienen la capacidad de ser absorbidos a través del epitelio intestinal (Sabbione y col., 2015; Sabbione y col., 2016). También se ha comprobado la disminución del colesterol por diferentes métodos. En hidrolizados por digestión *in vitro*, se caracterizó la liberación de tres péptidos con actividad inhibidora de la HMG-CoA reductasa (enzima que controla la velocidad de la vía del mevalonato, la vía metabólica que produce colesterol y otros isoprenoides), identificando GGV, IVG o LVG y VGVI (Soares y col., 2015). Cuando se administraron proteínas de amaranto a hámsters con hipercolesterolemia, mostraron un 27% en la reducción del colesterol plasmático, mientras que el grupo alimentado con caseína láctea mostró una reducción del 48% (Mendonça y col., 2009), con resultados similares obtenidos de ratas wistar (Lado y col., 2015). En ambos estudios *in vivo*, el posible mecanismo de reducción de colesterol en plasma fue el aumento en la excreción de colesterol fecal.

La diabetes es un trastorno metabólico caracterizado por altos niveles de glucosa en plasma, afecta a más de 422 millones de personas en el mundo y su prevalencia aumenta rápidamente en los países de ingresos medios y bajos (OMS, 2016). Algunos de los posibles tratamientos es el uso de terapia basada en incretina, que son hormonas peptídicas liberadas por las células enteroendocrinas intestinales en el torrente sanguíneo en respuesta a la ingesta de nutrientes, las cuales estimulan la secreción de insulina. Sin embargo, estos tienen una vida corta debido a su

inactivación por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Por lo que actualmente los inhibidores de la DPP-IV tienen un nuevo interés como agentes antidiabéticos, ya que han mostrado resultados prometedores en la disminución de glucosa sérica (Liu y col., 2019; Ojeda-Montes y col., 2018). Los hidrolizados de proteína de amaranto de una digestión *in vitro*, demostraron tener actividad inhibitoria de la DPP-IV con un IC₅₀ de 1.1 mg/ml además de que se logró identificar *in silico* al tripéptido IPE como inhibidor (Velarde-Salcedo y col., 2013). Cuando se utilizaron proteínas de amaranto hidrolizadas con alcalasa en ratones diabéticos, se observó una mejoría en la tolerancia a la glucosa con incrementos notables en insulina plasmática (Soriano-Santos y col., 2015).

No solo los péptidos de proteínas de amaranto que promueven la salud han sido probados. Se ha demostrado también que tienen un efecto insecticida contra larvas de insectos (*Tribolium castaneum* y *Prostephanus truncatus*); antimicrobianos contra diferentes hongos (*Fusarium culmorum* (Smith) Sacc., *Helminthosporium sativum* Pammel., King et Bakke, *Alternaria consortiale* Fr., y *Botrytis cinerea* Pers.) con efecto probado en diferentes plantas de amaranto como *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus hypochondriacus*. Estos péptidos son capaces de inhibir la tripsina o α amilasa de los insectos; o el crecimiento de los hongos, con efectividad demostrada mayor a la de otros insecticidas químicos o productos antimicrobianos (Chagolla-López y col., 1994; Broekaert y col., 1992; Lipkin y col., 2005; Valdes-Rodríguez y col., 1993).

Conclusión

Los péptidos bioactivos han atraído el interés de los investigadores como un ingrediente funcional que promueve la salud. En consecuencia, la alergenicidad, la toxicidad y la estabilidad de sus funciones biológicas durante la digestión gastrointestinal deben probarse en la formulación de productos incorporados con péptidos bioactivos. Además, los efectos observados preliminares de los péptidos bioactivos derivados del amaranto sobre enfermedades objetivo deben considerarse cuidadosamente antes de que puedan formularse como agentes y puedan ser usados directamente. Por lo tanto, la separación e identificación de los péptidos y sus parámetros farmacodinámicos son necesarios para transferir sus potentes propiedades funcionales a las aplicaciones alimentarias y clínicas. Las investigaciones científicas y el desarrollo industrial en la dirección de la búsqueda de nuevos péptidos bioactivos prometen formular varios medicamentos y alimentos funcionales beneficiosos para la salud.

Referencias

- Adhikary, D., y Pratt D.B. (2015) Morphological and Taxonomic Analysis of the Weedy and Cultivated *Amaranthus hybridus* Species Complex. *Systematic Botany* 40: 604-610.
- Aguilar, E.G., Cantarelli, M.A., Marchevsky, E.J., Escudero, N.I., y Camiña, J.M. (2011) Multielemental Analysis and Classification of Amaranth Seeds According to Their Botanical Origin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59: 9059-9064.
- Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F., y Hernández-Mendoza, A. (2017) Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science* 100: 65-75.
- Akpmedo, K.M., y Bracquart, P.A. (1983). Uptake of branched-chain amino acids by *Streptococcus termophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 136-140.
- Alencar, N.M.M., de Morais, E.C., Steel, C.J., y Boloni, H.M.A. (2016) Sensory characterisation of gluten free bread with addition of quinoa, amaranth flour and sweeteners an alternative for celiac patients. *International Journal of Food Science and Technology* 52: 872-879.
- Aluko, R.E. (2015) Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 235-262.
- Amicarelli, V., Notarnicola, L., Aveni, M., y Colucci, L. (2002) La coltivazione di alcune specie di amaranto in Puglia. Nota I: Aspetti merceologici, En: A partnership for training, research, employment and social development. Rome: University and Enterprise, pp. 86-96
- Amicarelli, V., y Camaggio, G. (2012) Amaranthus: a crop to rediscover. *Forum Ware International* 2: 4-11.
- Ayyash, M., Al-Dhaheeri, S., Mahadin, S., Kizhakkayil, J., y Abushelaibi, A. (2018) *In vitro* investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Dairy Science* 101: 900-911.
- Barba de la Rosa, A.P., Gueguen, J., Paredes-López, O., y Viroben, G. (1992) Fractionation procedure, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 931-936.
- Barba de la Rosa, A.P., Herrera-Estrella, A., Utsumi, S., y Paredes-López, O. (1996) Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology* 149: 527-532.
- Barba de la Rosa, A.P., Barba-Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M.F., De León-Rodríguez, A., y González, C. (2010) Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* 23: 106-111.
- Barrio, D.A., y Añón, M.A. (2010) Potential antitumor properties of a protein isolated obtained from the seeds of *Amaranthus mentagazzianus*. *European Journal of Nutrition* 49: 73-82.
- Becker, R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A.E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A., y Saunders, R.M. (1981) A compositional study of Amaranth grain. *Journal of Food Science* 46: 1175-1180.
- Bhutia, D.D., y Maiti, T.K. (2008) Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology* 26: 210-217.
- Borghi, C., y Cicero A.F. (2016) Nutraceutical with clinical detectable blood pressure lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83: 163-171.
- Borneo, R., y Aguirre, A. (2008) Chemical composition, cooking cereals, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT-Food Science and Technology* 41:1748-1751.
- Bressani, R. (1993) Amaranth, In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Editors). *Encyclopedia of Food Science, Technology and Nutrition*, vol. 1, Academic Press: London, pp. 135-140.
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R.G., De Bolle, F.C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J., y Cammue, B.P.A. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/Glycine-rich domain of chitin-binding protein. *Biochemistry* 31: 4308-4314.
- Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R.Z., y Laganá, A. (2015)

- Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis* 44: 205-213.
- Carrasco-Peña, L., Osuna-Castro, J.A., De León-Rodríguez, A., Maruyama, N., Toro-Vazquez, J.F., Morales-Rueda, J.A., y Barba de la Rosa, A.P. (2013) Modification of Solubility and heat-induced gelation of amaranth 11S globulin by protein engineering. *Journal of Food Chemistry* 61: 3509-3516.
- Caselato-Sousa, V.M., y Amaya-Farfán, J. (2012) State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive Review. *Journal of Food Science* 4: 93-104.
- Castro-Martínez, C., Luna-Suárez, S., y Paredes-López, O. (2012) Overexpression of a modified protein from amaranth seed in effect of environmental condition on the protein expression. *Journal of Biotechnology* 158: 59-67.
- Chabance, B., Jollés, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., y Fiat A.M. (1995) Characterization of an antithrombotic peptide from k-casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition* 73: 583-90.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Patthyl, A., Sánchez, R., y Pongor, S. (1994) A novel α -amylase inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) Seeds. *Journal of Biological Chemistry* 269: 23675-23680.
- Chalamaiah, M., Yu, W., y Wu, J. (2018) Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry* 245: 205-222.
- Chang, O.K., Perrin, C., Galia, W., Saulnier, F., Miclo, L., Roux, E., Driou, A., Humbert, G., y Dary, A. (2012). Release of cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44. *International Dairy Journal*, 23, 91-98.
- Chang, O.K., Roux, E., Awussi, A.A., Miclo, L., Jardin, J., Jameh, N., Dary, A., Humbert, G., y Perrin, C. (2014). Use of a free of the *Streptococcus thermophilus* cell envelope protease PrtS as a tool to produce bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 38, 104-115.
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F., y Nokihara, F. (1996) Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide derived from digests of soybean peptide. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 2619-2623.
- Ciau-Solís, N., Acevedo-Fernández, J.J., y Betancur-Ancona, D. (2017) In vitro renin-angiotensin system inhibition and in vivo antihypertensive activity of peptide fraction from lime bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98:781-786.
- Cicero, A.F., Colletti, A., Rosticci, M., Cagnati, M., Giovannini, M., Borghi, C., y D'Addato, S. (2016) Effect of lactotripeptides (Isoleucine-Proline-Proline/Valine-Proline-Proline) on Blood Pressure and Arterial Stiffness Changes in Subjects with suboptimal Blood Pressure Control and Metabolic Syndrome: A double-Blind, Randomized, Crossover Clinical Trial. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 14: 161-166.
- Coelho, M.S., Soares-Freitas, R.A.M., Gómes-Areas, J.A., Ávila-Gandra, E., y Salas-Mellado, M.M. (2018) Peptides from Chia Present Antibacterial Activity and Inhibit Cholesterol Synthesis. *Plants Foods for Human Nutrition* 73:101-107.
- Condés, M.C., Scilingo, A.A., y Añón, M.C. (2009) Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *Food Science and Technology* 42:963-970.
- Daliri, E.B.M., Lee, B.H., Park, M.H., Kim, J.H., y Oh, D.H. (2018) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein isolates fermented by *Pediococcus pentosaceus* SDL1409. *Food Science and Technology* 93:88-93.
- David-Birman, T., Raften, G., y Lesmes, U. (2018) Effects of thermal treatments on the colloidal properties, antioxidant capacity and in vitro proteolytic degradation of crocket flour. *Food Hydrocolloids* 79: 48-54.
- de Mejía, E.G., y Dia, V.P. (2010) The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Reviews* 29: 511-528.
- De Lumen, B.O. (2005) Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutrition Reviews* 63: 16-21.
- e Silva, F.G.D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F.M., y Miralles, B. (2017) Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase hydrolysis: Antioxidant activity. *Food Science and Technology* 76: 140-146.
- Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Schlegel, P., Stoll, P., Vegeres, G., Dupont, D., y Portmann, R. (2017) Digestion of milk protein: Comparing static and

dynamic in vitro digestion systems with in vitro data. *Food Research International*

Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., Van Platerink, C., Koning, T.M.M.G., y Kloek, J. (2007) Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage Are Absorbed Intact into the Circulation. *Journal of Nutrition* 137: 953-58.

Freitas, C.S., Vericimo, M.A., da Silva, M.L., da Costa, M.G.C., Pereira, P.R., Poschoalin, V.M.F., y Del Aguila, E.M. (2019) Encrypted antimicrobial and antitumoral peptides recovered from a protein-rich soybean (*Glycine max*) by product. *Journal of Functional Foods* 54:187-98.

Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., y Añón, M.C. (2011) Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry* 126:878-84.

Gallego, M., Mora, L., Escudero, E., y Toldrá, F. (2018) Bioactive peptides and free amino acids profile in different types of European dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 276:71-78.

Garault, P., Le Bars, D., Besste, C., y Monnet, V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus termophilus*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 32-39.

García-González, A., Flores-Vázquez, A.L., Barba de la Rosa, A.P., Vázquez-Martínez, E.A., y Ruiz-García, J. (2013) Amaranth 7S globulin, Langmuir films and its interaction with 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine at the air–fluid interface. *Journal of Physical Chemistry B* 117, 14046.

Gaspar, D., Veiga, A.S., y Castanho, M.A.R.B. (2013) From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Microbiology* 4: 1-16.

Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., y Mulligan, C. (2004) Production and Characterization of Bioactive Peptides from soy hysrolysates and soy fermented food. *Food Research International* 37:123-131.

González de Mejía, E., Bradford, T., y Hasler, C. (2003) The anticarcinogenic Potential of Soybean Lectin and Lunasin. *Nutrition Reviews* 61: 239-246.

González de Mejía, E., Vasconez, M., y De Lumen, B.O. (2004) Lunasin concentration in different soybean genotypes, comercial protein, and isoflavones products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 5882-5887.

González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J.M., Mora-Escobedo, R., y Martínez-Villaluenga, C. (2018) Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human color cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry* 242:75-82.

Grobelnik-Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., y Bavec, M. (2010) Grain amaranth as an alternative and perspective in temperature climate. *Journal for Geography* 5: 135-145.

Grootaert, C., Jacobs, G., Matthijs, B., Pitart, J., Baggerman, G., Possemiers, S., Van der Saag, H., Smagghe, G., Van Camp, J., y Voorspoels, S. (2017) Quantification of egg ovalbumin hydrolysate-derived antihypertensive peptides in an in vitro model combining luminal digestion with intestinal Caco-2 cell transport. *Food Research International* 99: 531-541.

Hartmann, R., y Meisel, H. (2003) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169.

Heefner, D.L., y Harold, F.M. (1982) ATP-derived sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* 79, 2788-2802.

Hernández-Ledesma, B., y Chia-Chien, H. (2017) Chemopreventive role of food-derived proteins and peptides: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56: 2358-2376.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grosseird, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C.L., Monnet, V., Guedon, E., Renault, P., y Kleerebezem, M. (2005). New insight in the molecular biology and physiology of *Streptococcus termophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Review* 29, 435-463.

Jenssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jensens, K.J.A., Deleu, L.J., y Delcour, J.A. (2017) Proteins of Amaranth (*Amaranthus* spp.) Buckwheat (*Fagopyrum* spp) and Quinoa (*Chenopodium* spp.): A food Science and Technology Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Nutrition* 16: 39-58.

Joeng, H.J., Lam, Y., y De Lumen, B.O. (2002) Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 5903-5908.

- Joeng, H.J., Joeng, J.B., Kim, D.S., Park, J.H., Lee, J.B., Kwoen, D.H., Chung, G.Y., Seo, E.W., y De Lumen, B.O. (2007) The cancer preventive peptide lunasin from wheat is bioavailable and inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters* 255:42-48.
- Jullie, O., Le Bars, D., y Juillard, V. (2005) The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus termophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology* 151, 1987-1994.
- Kitts, D.D., y Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309–1323.
- Kurek, M.A., Karp, S., Wyrwiz, J., y Niu, Y. (2018) Physicochemical properties of dietary fibers extracted from gluten-free sources: quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthis caudatus*) and millet (*Panicum miliaceum*). *Food Hydrocolloids* 85:321-330.
- Lamarque, M., Charbonnel, P., Aubel, D., Piard, J., Atlan, D., y Jullard, V. (2004) A multifunctional ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *Journal of Bacteriology* 186, 6492-6500.
- Lado, B.A., Burini, J., Rinaldi, C., Añón, M.C., y Tironi, V.A. (2015) Effects of the Dietary Addition of Amaranth (*Amaranthus mentagazzianus*) Protein Isolate on Antioxidant Status, Lipid profiles and Blood Pressure of Rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 70: 371-379.
- Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R., Naidu, V.G.M., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., y Nagpal, R. (2013) Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation and Allergy Drug Targets* 12: 349-361.
- Letort, C., y Juillard, V. (2001) Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus termophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 3162-3165.
- Liang, N., y Kitts, D. (2014) Antioxidant property of coffee Components: Assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* 19: 19180-19198.
- Lin, Q., Liao, W., Bai, J., Wu, W., y Wu, J. (2017) Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-SerTrp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells. *Journal of Functional Foods* 34: 248-253.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., y Egrov, T. (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* 66: 2426-2431.
- Liu, R., Cheng, J., y Wu, H. (2019) Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. *International Journal of Molecular Science* 20: 1-22.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Gómez, B., Barba, F.J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., y Toldrá, F. (2018) Bioactive peptides as natural antioxidants in food products- A review. *Trends in Food Science and Technology* 79: 136-147.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., y Paredes-López, O. (2010) Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of angiotensin I convertinh enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 148: 240-247.
- Majumder, K., Mine, Y., y Wu, J. (2015) The potential of food protein-derived anti-inflammatory diseases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 2303-2311.
- Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H.J., León-Galván, P., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., González de Mejía, E., de Lumen, B.O., y Barba de la Rosa, A.P. (2016) Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 31: 1635-1641.
- Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K., y Kawasaki, T. (2002) Absorption of Val-Tyr with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of mild hypertensive subjects. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 1228-1230.
- Mechmeche, M., Ksontini, H., Hamdi, M., y Kachouri, F. (2017) Production of bioactive peptides in tomato seed protein isolate fermented by water kefir culture: Optimization of the fermentation conditions. *International Journal of Peptides Research and Therapeutics* 137-150.
- Medina-Godoy, S., Rodríguez-Yáñez, S.K., Bobadilla, N.A., Pérez-Villalba, R., Váldez-Ortiz, R., Hong, E., Luna-Suárez, S., Paredes-López, O., y Valdez-Ortiz, A. (2013) Antihypertensive activity of AMC3, and engineered 11S amaranth globulin expressed in *Escherichia coli*, in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* 5:1441-1449.

- Mendonça, S., Saldiva, P.H., Cruz, R.J., y Arêas, J.A.G (2009) Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry* 116:738-742.
- Meram, C., y Wu, J. (2017) Anti-inflammatory effects of egg yolk livetins (α , β , and γ -livetins) fraction and its enzymatic hydrolysates in lipopolysaccharide-induced RAW 2647.7 macrophages. *Food Research International* 100:449-459.
- Montoya-Rodríguez, A., y González de Mejía, E. (2015) Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development in vitro. *Food Research International* 77:204-214.
- Montoya-Rodríguez, A., González de Mejía, E., Dia, V.P., Reyes-Moreno, C., y Milán-Carrillo, J. (2014a) Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- κ B signaling. *Molecular Nutrition and Food Research* 58:1028-1041.
- Montoya-Rodríguez, A., Milán-Carrillo, J., Dia, V.P., Reyes-Moreno, C., y González-Mejía, E. (2014b) Pepsin-pancreatin protein hydrolysates from extruded amaranth inhibit markers of atherosclerosis in LPS-induced THP-1 macrophages-like human cells by reducing expression of proteins in LOX-1 signaling pathway. *Proteome Science* 12: 1-12.
- Morales-Camacho, J.I., Paredes-López, O., Espinosa-Hernández, E., Fernández-Velasco, D.A., y Luna-Suárez, S. (2016) Expression, purification and thermal stability evaluation of an engineered amaranth protein expressed in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology* 22:44-51.
- Moreira, R. de A., Ainouz, I.L., De Oliveira, J.T., y Cavada, B.S. (1991) Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memórias do Instituto de Oswaldo Cruz* 86: 211-218.
- Moronta, J., Smaldini, P.L., Docena, G.H., y Añón, M.C. (2016a) Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods* 21: 463-473.
- Moronta, J., Smaldini, P.L., Fossati, C.A., Añón, M.C., y Docena, G.H. (2016b) The anti-inflammatory SEDIKE peptide from Amaranth seeds modulates IgE-mediated food allergy. *Journal of Functional Foods* 25:579-587.
- Ojeda-Montes, M.J., Gimeno, A., Tomas-Hernández, S., Cereto-Massagué, A., Beltrán-Debón, R., Valls, C., Mulero, M., y Pujadas, G. (2018) Activity and Selectivity cliffs for DPP-IV inhibitors: Lessons we can learn from SAR studies and their application to virtual screening. *Medicinal Research Reviews* 38: 1874-1915.
- Orsini-Delgado, M.C., Tironi, A.V., y Añón, C.M. (2011) Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology* 44: 1752-1760.
- Orsini-Delgado, M.C., Galleano, M., Añón, M.C., y Tironi, V.A. (2015) Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species. *Plant Foods for Human Nutrition* 70: 27-34.
- Orsini-Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M.C., y Tironi, V.A. (2016) Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry* 197:1160-1167.
- Pieretti, P.G., Meineri, G., Gai, F., Longato, E., y Amarowicz, R. (2017) Antioxidant activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Products Research* 31: 2178-2182.
- Pihlanto, A. (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16: 1306-1314.
- Poolman, B., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Jullard, V., y Konings, W.N. (1995) The proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 179-203.
- Quiroga, A.V., Barrio, D.A., y Añón, M.C. (2015) Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *Food Science and Technology* 60: 478-485.
- Quiroga, A.V., Martínez, N.E., Rogniaux, H., Geariron, A., y Añón, C.M. (2009) Globulin-p and 11S-globulin from *Amaranthus hypochondriacus*: are two isoforms of the 11S-globulin. *Protein Journal* 28: 457-467.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Ventureira, J.L., Martínez, N.E., y Añón, M.A. (2011) Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:397-403.
- Rastogi, A., y Shukla, S. (2013) Amaranth a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53: 109-125.

- Rul, F., y Monnet, V. (1997) Presence of additional peptidases in *Streptococcus termophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 695-704.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A., y Añón, M.C. (2015) Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Food Science and Technology* 60:171-177.
- Sabbione, A.C., Nardo, A.E., Añón, M.C., y Scilingo, A. (2016) Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* 20:204-214.
- Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Guadichon, C., y Recio, I. (2018) Protein degradation and peptides release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chemistry* 239:486-494.
- Sarker, U., Islam, M.T., Rabbani, M.G., y Oba, S. (2017) Phenotypic divergence in vegetable amaranth for total antioxidant capacity, antioxidant profile, dietary fiber, nutritional and agronomic traits. *Acta Agriculturae Scandinavica B-Soil & Plant Science* 68: 67-76.
- Sarmadi, B., e Ismail, A. (2010) Antioxidant peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31:1306-1314.
- Savijoki, K., Ingmer, H., y Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 394-406.
- Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., y Valesini, G. (2011) Inflammation as 'common soil' of themultifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews* 10: 369–374.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L.E., Rodriguez-Nester, C.E., y Herrera-Estrella, L. (1992) Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40:1553–1558.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A.P., y Paredes-Lopez, O. (1994) Biochemistry of amaranth proteins. In: Paredes-Lopez O (ed), *Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp: 75–106.
- Serhan, C.N., y Saville, J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology* 6: 1191–1197.
- Shevkani, K., Singh, N., Chand-Rana, J., y Kaur, A. (2013) Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 541-550.
- Simonetti, A., Perna, A., y Gambacorta, E. (2017) Dairy Products as Source of Angiotensin-I-Converting enzyme-Inhibitory (Ace-I) peptides. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 9-3.
- Silva-Sánchez, C., González-Castañeda, J., de León-Rodríguez, A., y Barba de la Rosa, A.P. (2004) Functional and Rheological Properties of Amaranth Albumins Extracted From Two Mexican Varieties. *Plant Foods for Human Nutrition* 59:169-174.
- Silva-Sánchez, C., de la Rosa, A.P., León-Galván, M.F., de Lumen, B.O., de León-Rodríguez, A., y de Mejía, E.G. (2008) Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 1233-1240.
- Soares, R.A.M., Mendonça, S., de Castro, L.I.A., Cardoso, A.C., Menezes, C.C., y Arêas, J.A.G. (2015) Major peptides from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA Reductase activity. *International Journal of Molecular Science* 16:4150-4160.
- Soriano-Santos, J., y Escalona-Buendía, H. (2015) Angiotensin I-Converting inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *Journal of Food Science and Technology* 52:2073-2082.
- Soriano-Santos, J., Reyes-Bautista, R., Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E., Escalona-Buendía, H.B., Almaza-Pérez, J.C., Díaz-Godinez, G., y Román-Ramos, R. (2015) Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolysates from *Amaranthus hypochondriacus* L. grain and their influence on postprandial glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary & Alternative Medicines* 12: 90-98.
- Su, M.Y., Broadhurst, M., Liu, C., Gathercole, J., Cheng, W., Qi, Y., Clerens, S., Dyer, J.M., Day, L., y Haigh, B. (2017) Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following in vitro digestion. *Food Chemistry* 221: 1895-1903.
- Suh, H.J., Whang, J.H., y Lee, H. (1999) A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I converting enzyme. *Biotechnology Letters* 21:1055-1058.

- Tang-Bin, Z., Tai-Ping, H., Hau-Bin, L., Huan-Wen, T., y En-Qin, X. (2016) The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules* 21:1-14.
- Tavano, O.L., Da-Silva, S.I., Demonte, A., y Neves, V.A. (2008) Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 11006–11010.
- Tandang-Silvas, M.R., Carrasco-Peña, L., Barba de la Rosa, A.P., Osuna-Castro, J.A., Utsumi, S., Mikami, B., y Maruyama, N. (2010) Expression, purification and preliminary crystallization of amaranth 11S proglobulin seed storage protein from *Amaranthus hypochondriacus* L. *Acta Crystallographica* 66: 919–922.
- Teutonico, R.A., y Knorr, D. (1985) Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered Food crop. *Food Technology* 39: 49-61.
- Tiengo, A., Faria, M., y Netto, E.M. (2009) Characterization and ACE-Inhibitory Activity of Amaranth Proteins. *Journal of Food Science* 5: H121-H126.
- Tironi, V.A., y Añón, M.C. (2010) Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International* 43:315-322.
- Tohma, H., Gülcin, I., Bursal, E., Gören, A., Alwasel, A., y Köksal, E. (2017) Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization* 11:556-566.
- Tovar-Pérez, E.G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., y Soriano-Santos, J. (2009) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry* 116: 437-444.
- Udenigwe, C., y Aluko, R. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77:R11-R24.
- Valdes-Rodríguez, S., Segura-Nieto, M., Chagolla-López A., Vargas-Cortina, A.V., Martínez-Gallardo, N., y Blanco-Labra, A. (1993) Purification, Characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiology* 103:1407-1412.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L., y Verstrete, W. (2003) Impact of Fermentation and In Vitro Digestion on the Formation of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activity from Pea and Whey Protein. *Journal of Dairy Science* 86:429-438.
- Vecchi, B., y Añón, M.C. (2009) ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry* 70:864-870.
- Velarde-Salcedo, A.J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G.M., Díaz-Gois, A., González de Mejía, E., y Barba de la Rosa, A.P. (2013). In vitro inhibition of dipeptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein. *Food Chemistry* 136:758-764.
- WHO (2016) Global Report on Diabetes. World Health Organization, WHO Press. www.who.int
- Yathisha, U.G., Bhat, I., Karunasagar, I., y Mamatha, B.S. (2018) Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 13:1-12.
- Zhang, J., Liu, L., Liu, H., Yoon, A., Rizvi, S.H., y Wang, Q. (2018) Changes in conformation and quality of vegetable protein during texturization process by extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12:1-14.
- Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., Bakar, F.A., Philip, R., y Saari, N. (2014) Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. *Food Research International* 62: 726-734.
- Zuhaib, F.B., Sunil, K., y Hina, F.B. (2017) Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Capítulo 2 . Nuevas secuencias de péptidos multi-bioactivos liberados por digestión *in vitro* de proteínas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)

RESUMEN

El amaranto es una semilla rica en proteínas altamente consumida en México y es una fuente potencial de péptidos bioactivos con diferentes efectos fisiológicos. Es así que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antihipertensiva, antitrombótica y antioxidante de fracciones peptídicas de proteínas de amaranto liberadas por una digestión *in-vitro* con pepsina y pancreatina. Las fracciones peptídicas alcanzaron un máximo de inhibición de enzima convertidora de angiotensina de 55% y de 75% de inhibición de trombina. La actividad antioxidante mostró un incremento estadísticamente significativo con la adición de pancreatina después de la hidrólisis con pepsina. Las secuencias liberadas de las fracciones peptídicas multifuncionales fueron identificadas por análisis con nano-LC-ESIMS/MS. Con estos resultados se demostró que el mecanismo de la digestión enzimática *in-vitro*, permite la liberación de fracciones peptídicas multibioactivas.

Palabras clave: actividad antihipertensiva, actividad antioxidante, actividad antitrombótica, proteínas de amaranto.

ABSTRACT

Amaranth is a protein-rich seed, highly consumed in Mexico and a potential source of bioactive peptides with various physiological effects. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antihypertensive, antithrombotic and antioxidant activity of peptide fractions from amaranth protein released by *in-vitro* digestion with pepsin and pancreatin. The peptide fractions reached a maximum of 55% and 75% inhibition of the angiotensin converting enzyme and inhibition of thrombin, respectively. The antioxidant activity showed a statistically significant increase with the addition of pancreatin after hydrolysis with pepsin. The sequences released from the multifunctional peptide fractions were identified by analysis with a nano-LC-ESIMS / MS. With these results, it was demonstrated that the *in vitro* enzymatic digestion mechanism allows the release of multibioactive peptide fractions.

Key words: antihypertensive activity, antioxidant activity, antithrombotic activity, amaranth proteins.

INTRODUCCIÓN

La familia *Amaranthus* tiene 70 géneros y más de 80 especies en todo el mundo. Las tres principales especies que producen granos son *Amaranthus hypochondriacus* (nativo de México), *Amaranthus caudatus* (nativo de Perú) y *Amaranthus cruentus* (nativo de México y Guatemala) (Délano-Frier y col., 2011). El amaranto se considera un alimento alto en proteínas (entre el 12 y el 17%), que contiene todos los aminoácidos esenciales requeridos para un ser humano adulto (Mlaker y col., 2010). Debido a esto, el amaranto puede ser una buena fuente de péptidos bioactivos, que se definen como fragmentos específicos de proteínas con función fisiológica positiva. Algunas de estas funciones pueden ser beneficiosas para el sistema digestivo, inmunológico o cardiovascular (Agyei y col., 2011).

Incluso cuando la digestión es la forma más común de obtener estos compuestos, la hidrólisis de una proteína utilizando enzimas comerciales es un método simple y económico para obtener péptidos y aminoácidos libres. Debido a esto, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la preparación de hidrolizados a partir de diferentes fuentes proteicas, utilizando diferentes proteinasas en un esfuerzo por obtener biopéptidos con actividad elevada (Wattamasirithama y col., 2016; Najafian y Babji, 2014; Baltia y col., 2015). Mediante el uso de pepsina y pancreatina en proteínas de amaranto y fracciones de proteínas, se ha reportado la liberación de péptidos antioxidantes y antitrombóticos (Orsini-Delgado y col., 2016; Sabbione y col., 2015; Orsini-Delgado y col., 2011).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares afectan al 30% de la población mundial, la mayoría de ellos ignoran su condición, mientras que aquellos que están bajo tratamiento médico sufren de los efectos secundarios de los medicamentos prescritos (WHO, 2017). Por lo tanto, la liberación de nuevos péptidos bioactivos de diferentes proteínas alimenticias podría significar una ventaja para prevenir enfermedades cardiovasculares en personas susceptibles a padecerlas.

Por este motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar la liberación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y antioxidantes de proteína de amaranto hidrolizados por pepsina y pancreatina en secuencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra y tratamientos

Las semillas crudas de amaranto se obtuvieron de Xochimilco, Ciudad de México. Las semillas se molieron en un molino Chopin, y solo se utilizó la fracción de sémola (tamaño de molécula entre 200 y 800 μm). La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología de Martínez y Añón (1996). La proteína obtenida fue liofilizada y almacenada a 4 °C hasta su uso.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó según lo descrito por Orsini-Delgado y col., (2016) con modificaciones. La proteína de amaranto se diluyó en agua desionizada (0.5: 10 p/v) y se trató inicialmente con solución de pepsina (EC 3.4.23.1; 345 U/mg; Sigma-Aldrich) (0.1equi/L de HCl, 0.03 mol/L de NaCl, pH 2) a una relación enzima/proteína de 1:10 p:p a 37 °C. El pH se ajustó a 6 y se añadió pancreatina (EC 232-468-9 4X a 100 USP unidades/mg; Sigma-Aldrich) en solución (0.1 mol/L de NaHCO₃ pH 6) (proporción enzima:proteína, 1:10 p/p). Se tomaron alícuotas de 5 mL cada 20 minutos durante 2 horas de reacción con cada enzima. La reacción se detuvo por calentamiento de las muestras a 85 °C durante 10 minutos. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron hasta su análisis.

Análisis de grupos amino libres mediante test de TNBS

Los péptidos solubles durante la hidrólisis se cuantificaron con TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico-Sigma-Aldrich), que forma un complejo cromóforo con aminas primarias en condiciones alcalinas (pH 8.2), con una absorbancia máxima a 340 nm. Los resultados se compararon con una curva de calibración de glicina a diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron como mg de aminas libres por litro (mg/L NH) (Sahidhar y col., 1994).

Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico de glicina (SDS-PAGE de glicina)

Para observar los cambios generados en la proteína durante la hidrólisis, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE con glicina. Las condiciones se llevaron a cabo en el siguiente sistema de tampón continuo: Tris-HCl 0.055 M, pH 6.8; Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 para el gel de separación; glicina Tris-HCl, SDS pH 8.3 para el tampón de corrida (Laemmli, 1970). El gel de separación se preparó con acrilamida al 15% (p/v). Las muestras de proteína (0.4 mg/mL para proteínas aisladas del hidrolizado de pepsina y 4 mg/mL de hidrolizado de pepsina-pancreatina) se utilizaron para

cargar el gel (15 µL por carril) y las pruebas electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 200 V. Los pesos moleculares de los polipéptidos se calcularon utilizando BIO-RAD SDS-PAGE Estándar de Peso Molecular de Amplio Rango. La imagen del gel se analizó con BIO-RAD Gel-Doc EZ Imager.

Actividad antihipertensiva

Efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1, Sigma-Aldrich) se evaluó mediante espectrofotometría según Cushman y Cheung (1977). La reacción consistió en mezclar 100 µL del sustrato Hippuril-Histidil-Leucina (HHL; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) con 40 µL de la muestra y 10 µL de ACE (EC 3.4.15.1, 5.1 U / mg; Sigma-Aldrich). Dicha mezcla, se incubó durante 1 hora y 15 minutos a 37°C, inactivando la reacción al agregar 1 mL de HCl 0.1M. El ácido hipúrico, que se formó en ausencia de un inhibidor, se extrajo con acetato de etilo y se disolvió en agua destilada y la absorbancia se midió a 220 nm, en un espectrómetro Power Wave XS UV-Biotek (software KC Junior, EE. UU.). La actividad inhibitoria de la ECA se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de actividad inhibitoria} = (\text{AbsC} - \text{AbsM}) / (\text{AbsC} - \text{AbsB}) \times 100$$

Donde:

AbsC = ácido hipúrico formado durante la acción de la ECA sin inhibidor;

AbsM: ácido hipúrico formado después de la acción de la ECA en presencia de una sustancia inhibidora;

AbsB: Hippuril-histidil-leucina no reaccionada que se ha extraído con acetato de etilo.

Capacidad antitrombótica

Para evaluar la actividad antitrombótica, se utilizó la metodología de Zhang y col., (2008). La reacción consiste en la mezcla de 140 µL de 0.1 g/100 mL de fibrinógeno (Sigma Chemical Co.), 40 µL de cada muestra o tampón (como control negativo de la inhibición de la coagulación) con 10 µL de trombina (12 UI/L1) (EC 3.4.15.1 Sigma Chemical Co). Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EE. UU.) antes y después de agregar la enzima y de ser incubada por 30 minutos a 37°C. El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C - CB) - (S - SB)] / (C - CB) * 100$$

Donde: C: La absorbancia del control negativo a los 10 minutos de incubación con trombina;

CB: la absorbancia inicial del control negativo de la inhibición;

S: La absorbancia de la muestra a los 10 minutos de incubación con trombina;

SB: La absorbancia inicial de la muestra.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue evaluada por tres métodos diferentes.

Prueba ABTS

La capacidad antirradical se midió con el catión radical ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS • +; Sigma-Aldrich) el cual fue preparado con 7mmol/L de solución madre ABTS•+ con 2.45 mmol/L persulfato de potasio en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes y diluido con agua desionizada hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 754 nm. La reacción se llevó a cabo al mezclar 20 μ L de muestra y 980 μ L de la solución de ABTS•+ diluida, midiendo por último su absorbancia a 754 nm después de 7 minutos de incubación a temperatura ambiente. La capacidad antioxidante se expresó como mg de equivalentes de Trolox por litro (mg TE/L) (Delgado-Andrade y col., 2005).

Prueba de DPPH

La actividad antirradical se midió utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH •; Sigma-Aldrich), el cual se preparó en solución etanólica (7.4 mg/100mL). Se mezclaron 100 μ L de muestra con 500 μ L de solución DPPH •. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 520 nm y se obtuvieron mg de equivalentes de Trolox por litro (mg TE/L) (Delgado-Andrade y col., 2005).

Prueba de FRAP

La actividad antioxidante de FRAP se evaluó de acuerdo con la metodología Benzie y Strain (1996). Para la preparación de FRAP se mezclaron tampón de acetato de sodio (pH 3.6, 0.3M); TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) y FeCl_3 (20 mM) en relación 10:1:1. La técnica consistió en mezclar 30 μ L de muestra, 900 μ L de solución FRAP y 90 μ L de agua destilada. La mezcla se agitó e incubó durante 10 minutos a 37°C, después de lo cual se leyó la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresaron como micromol equivalentes de Fe^{II} por 100 g ($\mu\text{molFe}^{II}/100 \text{ g}$).

Identificación de péptidos

La identificación de los péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía nano-líquida-electrospray ionización-tándem MS (nano-LC-ESIMS / MS) con un espectrómetro de masas de trampa iónica

Bruker Amazon ETD a través de la interfaz nano-ESI. Los espectros se procesaron con el software Proxeon (Easy-nL), con el que se generaron listas de picos adecuados para búsquedas en bases de datos. Los péptidos se identificaron mediante una búsqueda de iones MS/MS en la base de datos de proteínas UniProtKB. Para la identificación de péptidos, se consideraron los siguientes parámetros: enzima, trampa ESI; tolerancia de la masa del péptido, $\pm 0.1\%$; y fragmento de tolerancia de masa, ± 0.5 Da. Los resultados de la identificación de péptidos se sometieron a una evaluación manual.

Análisis estadístico

Todos los valores se obtuvieron por triplicado y se expresaron por desviación estándar de la media (DE). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$, con el sistema SPSS® para WINTM versión 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de grupos de aminos libres

Para conocer el momento de la máxima hidrólisis de la proteína de amaranto, se evaluó la concentración de grupos amino libre durante la hidrólisis con pepsina y pancreatina. Como podemos observar en la figura 2.1a, no se mostraron diferencias estadísticas significativas después del minuto 30 de la reacción con pepsina, mientras que la actividad hidrolítica de la pancreatina disminuyó aproximadamente en el minuto 90. La disminución de la hidrólisis enzimática está relacionada con la concentración de sustrato adicionado y la de producto formado. Existen varios estudios sobre diferentes proteínas y su hidrólisis con pepsina y pancreatina, en las que se probaron diferentes tiempos de hidrólisis con cada una de las enzimas (Orsini-Delgado y col., 2011; Orsini-Delgado y col., 2016; Sabbione y col., 2015). Orsini-Delgado y col., (2011, 2016) sometieron la proteína de amaranto a la hidrólisis con pepsina y pancreatina durante una hora con cada enzima. Pero cuando la proteína proviene de otras fuentes como la soja, la leche humana y aronia (mora norteamericana) el tiempo de reacción de hidrólisis con pepsina fluctúa de 30 minutos a una hora, mientras que la hidrólisis de pancreatina varía de 1 a 2 horas (Bermudez-Soto y col., 2007; Hernández-Ledesma y col., 2005; Lo y Li-Chan, 2005;). La variabilidad en los tiempos de reacción puede ser debido a la naturaleza de la proteína y la especificidad de la enzima. En la figura 2.1b se puede observar el gel electroforético SDS-PAGE glicina. En L1, el perfil de proteína del aislado de *A. hypochondriacus* fue igual al descrito anteriormente por Martínez y Añón (1996).

El hidrolizado con pepsina (L2) presentó bandas entre 37.3 y 26.9 kDa y numerosas bandas de menos de 19.6 kDa aparecen continuas; mientras que después de su hidrólisis con pancreatina (L3 y L4), solo se pueden observar bandas de 35 y 27.3 kDa, lo que puede explicar el aumento en la concentración de grupos amino libres después de la adición de pancreatina. Además, después de la hidrólisis de pancreatina, se pudo presentar la liberación de aminoácidos, resultados similares aquellos reportados por Orsini-Delgado y col., 2011.

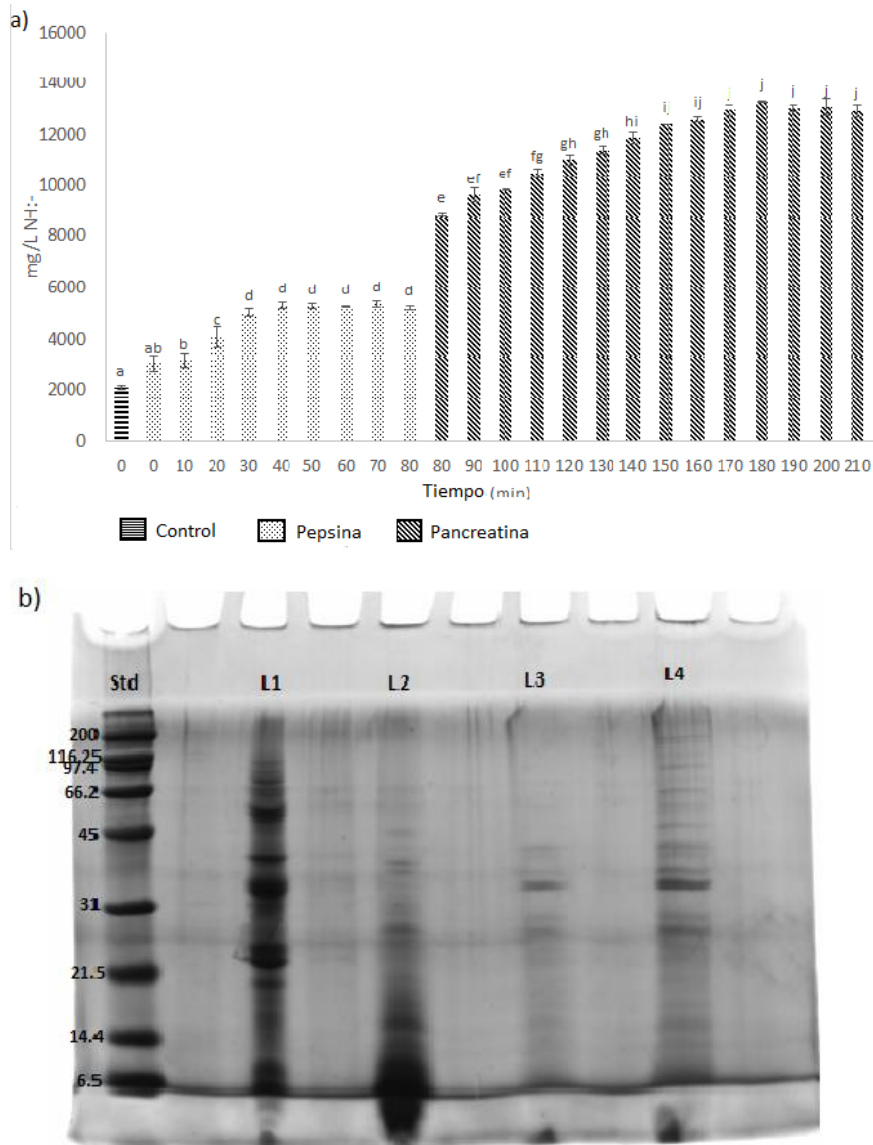


Figura 2.1. Concentración de grupos amino libres y electroforesis de hidrolizados de proteína de amaranto por digestión (Std: Estándar; L1: Línea1 proteína de amaranto; L2: línea 2 hidrolizado con pepsina; L3: Línea 3 hidrolizado con pepsina-pancreatina).

Actividad antihipertensiva y antitrombótica.

La inhibición de ECA y trombina aumentó con el tiempo de reacción, hasta alcanzar la inhibición más alta en el minuto 160 de hidrólisis, momento en el que también termina la actividad hidrolítica de la pancreatina (Figura 2.2 a y b). El aumento de la actividad antihipertensiva durante la hidrólisis puede estar relacionado con la liberación de péptidos con bajo peso molecular. La característica principal de estos péptidos es el tamaño, péptidos con secuencias cortas entre 2 y 12 aminoácidos (Aluko, 2015). Además, cuando se tiene un mayor fraccionamiento proteico, la concentración de péptidos de bajo peso molecular aumenta y como resultado, aumenta la inhibición de ECA (Fritz y col., 2011; Parris y col., 2008). Además, debe considerarse que al final de la hidrólisis se obtuvo un grupo de péptidos de las diferentes fracciones de proteínas en el amaranto, como la albúmina 1 y globulinas, proteínas que han demostrado ser fuente de péptidos bioactivos. Los estudios de mapeo de péptidos en la globulina 11S de amaranto mostraron que podrían liberarse péptidos con alta actividad antihipertensiva (Vecchi y Añón, 2009). Cabe señalar que al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los de hidrolizados de proteínas de leche, los porcentajes de inhibición de ECA al final de la digestión de proteína de amaranto son menores (Wattamasirathama y col., 2016).

De acuerdo a Sabbione y col., (2015), quienes realizaron hidrólisis de proteína de amaranto, la actividad antitrombótica también está relacionada con el grado de hidrólisis, y con las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos. Esto se debe a que la actividad antitrombótica se ha relacionado con la presencia en los sitios del péptido, de Arg en P1, Pro en P2 y Ala en P4, basada en una estructura H₂N-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-COOH (Sabbione y col., 2016). Sabbione y col., (2015) en un ensayo *in silico* encontraron que la proteína de amaranto hidrolizada con pepsina y pancreatina puede tener actividad antitrombótica, debido a que los péptidos derivados cumplen con las características para inhibir a trombina en su exosítio I y exosítio II. Este tipo de péptidos se pueden encontrar en hidrolizados de globulina y de albúmina (Sabbione y col., 2015) con un porcentaje inhibitorio superior al encontrado en los hidrolizados de proteínas de claras de huevo (Yang y col., 2007).

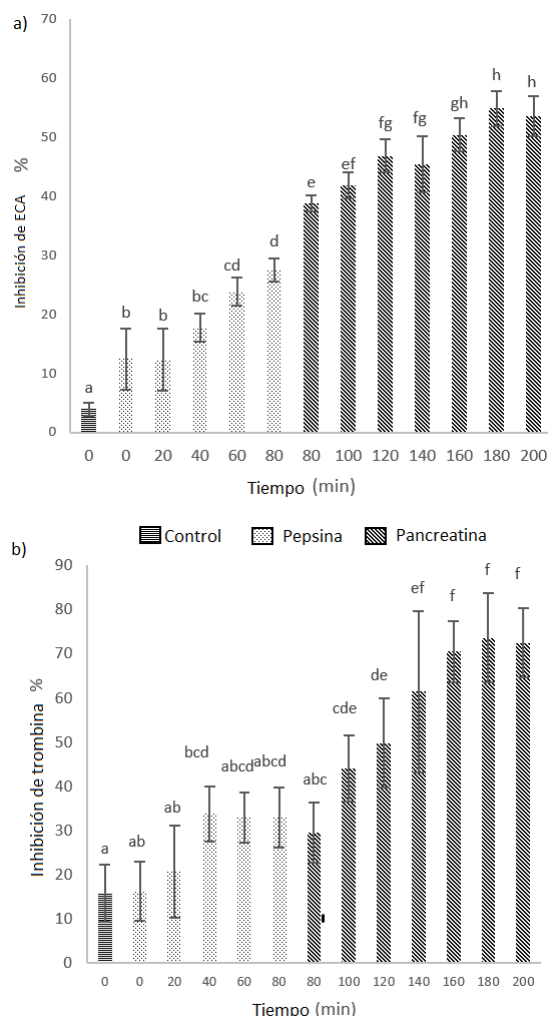


Figura 2.2. Inhibición de ECA y Trombina de hidrolizados de proteína de amaranto.

Actividad antioxidante

Los mecanismos de acción de los péptidos antioxidantes no han sido elucidados por completo, pero algunos estudios han demostrado que pueden ser eliminadores de radicales libres, quelantes de metales o inhibidores de la peroxidación de lípidos. En los tres ensayos se mostró un aumento de la actividad antioxidante conforme aumentó el tiempo de hidrólisis (figura 2.3). La determinación de la actividad antioxidante con ABTS obtuvo la mayor actividad en el minuto 120, mientras que con FRAP y DPPH, la mayor actividad se mostró después del minuto 160. El aumento de la actividad antioxidante podría deberse a la presencia de péptidos con determinadas características, que tienen relación con la actividad antioxidante como lo son: el tamaño molecular (cadenas de aminoácidos entre 2 a 20 unidades), hidrofobicidad y composición de aminoácidos

(histidina, cisteína, prolina, metionina, lisina y aminoácidos aromáticos) (Peña-Ramos y col., 2004; Stadtman y Levine, 2003). Además, en el presente estudio la mayor capacidad antioxidante está relacionada con la mayor concentración de grupos amino libres, lo que demuestra que el proceso de hidrólisis extensa está relacionado con el incremento de esta bioactividad, lo que también ha sido probado por otros estudios (Dai y col., 2017; Orsini-Delgado y col., 2016; Udenigwe y Aluko, 2012). Al mismo tiempo, se ha demostrado que las enzimas pepsina y pancreatina, son enzimas con una alta posibilidad de liberar péptidos antioxidantes, esto quizá debido a la especificidad de dichas enzimas y el tamaño de péptido que se obtiene al finalizar la hidrólisis, la cual ha sido probada en distintas matrices proteicas (Dai y col., 2017; Orsini-Delgado y col., 2016; Udenigwe y Aluko, 2012).

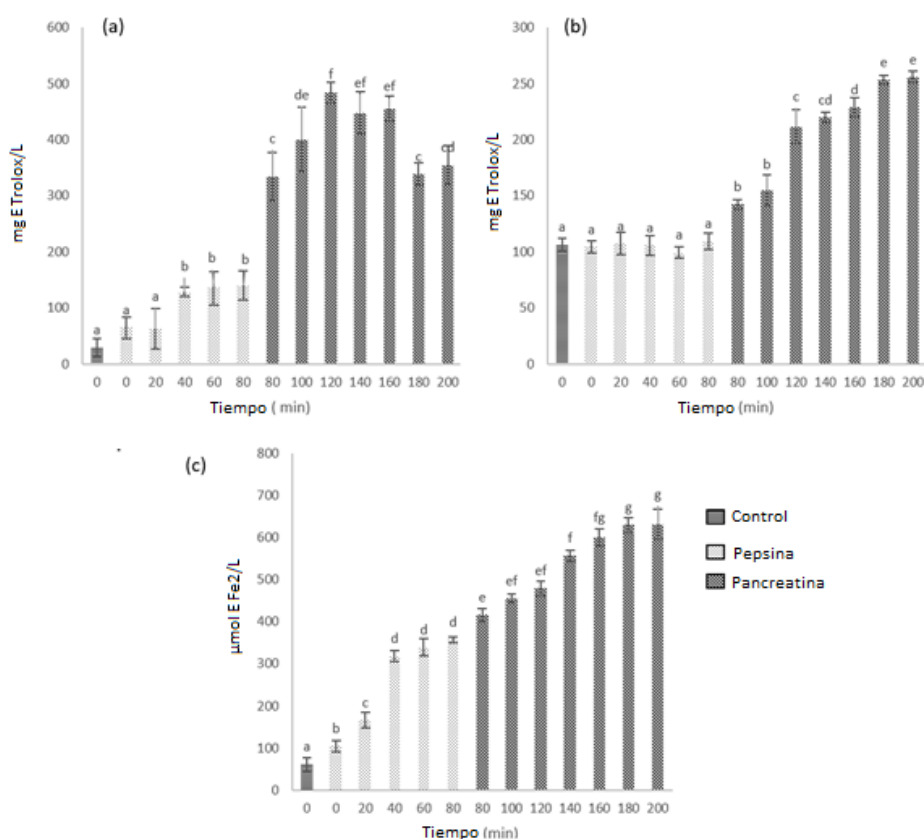


Figura 2.3.

Actividad antioxidante por ABTS, DPPH y FRAP de proteína de amaranto hidrolizada por digestión *in vitro*.

Identificación de péptidos.

Se identificaron siete péptidos de 8 a 22 residuos de aminoácidos, con masas moleculares que variaron de 1,383.6 a 2,870.2 Da mediante análisis nano-LC-ESI-MS/MS (Tabla 2.1). Ninguno de los péptidos descritos en la tabla 2, se han identificado en estudios anteriores durante la digestión *in*

vitro de péptidos de amaranto. Se ha demostrado que los péptidos con actividad inhibidora de la ECA tiene aminoácidos alifáticos en el extremo N-terminal (Nanhui y col., 2018; Zhang-Ji y col., 2018). También los aminoácidos hidrófobos, han

demostrado mejorar la actividad antioxidante en los péptidos, esto debido a su capacidad para mejorar el transporte del péptido a través de la membrana celular lo que promueve la inhibición de la especie radical en células (Elias y col., 2008). Los péptidos APIALPMDTFK, VALQGLNK y ADEISNIIRER (tabla 2.1), cuentan con la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, por lo que podrían ser péptidos con capacidad antihipertensiva; al mismo tiempo en su estructura se observan los aminoácidos alanina y valina, los cuales han demostrado ser inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

Por otro lado, los péptidos antitrombóticos se han relacionado más con la secuencia de aminoácidos que con su peso molecular, ya que se han encontrado péptidos con esta actividad con un peso molecular tan pequeño como el péptido encontrado en la piel de caballa FGN, y tan grande como el Drucalin peptídico con un peso molecular de 83 kDa (Atanassov y Tchorbanov, 2009; Khleri y col., 2014). Otra característica de estos péptidos es un alto contenido en isoleucina, leucina y aspartato (Shimizu y col., 2009); se puede observar que los péptidos en la tabla 2.1 pueden tener dos o más residuos de cada uno estos aminoácidos, aunque aun faltan estudios para identificar los mecanismos y la interacción entre las plaquetas de la sangre y los inhibidores de la trombina.

Tabla 2.1. Secuencias con actividad antitrombótica presentes en las proteínas de amaranto.

Pico	Secuencia	Punto	Calculado	Esperado	Cambio
51	APIALPMDTFK	11	1218.6318	1218.4882	-0.1437
56	VALQGLNK	17	841.5021	841.4674	-0.0347
118	ADEISNIIRER	12	1314.6891	1314.4774	-0.2117
145	KSSSFYSISLWGK	11	1488.7613	1488.6352	-0.1261
149	SPTGEVIFGGETMR	10	1495.6977	1496.5282	0.8305
310	TSYGFDVLLSATSGPAFNAGR	10	2130.0382	2130.0309	-0.0073
415	MGIHGHPLIQLFYALRCSR	11	2571.2838	2571.1552	-0.1287

CONCLUSIONES

La hidrólisis con pepsina y pancreatina de las proteínas de amaranto, permitió la liberación de péptidos con múltiples bioactividades. Los péptidos obtenidos con la hidrólisis de pepsina y pancreatina, mostraron inhibición de trombina y ECA, con valores superiores al 50% de inhibición de cada una de las enzimas. Además, la actividad antioxidante aumentó de manera significativa después de la adición de la segunda enzima, lo que demuestra que un mayor grado de hidrólisis permite una mayor actividad antioxidante. La relevancia de estos resultados apunta a aumentar el conocimiento sobre proteínas alimentarias de origen vegetal endémicas de México, como el amaranto, ya que las nuevas secuencias identificadas crean una nueva expectativa para encontrar una fuente alternativa de péptidos bioactivos.

REFERENCIAS

- Ageyi, D., y Danquah, M.K. (2011) Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 29: 272- 277.
- Aluko, R.E. (2015) Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 235-262.
- Atanassov, A., y Tchorbanov, B. (2009) Synthetic and Natural Peptides as Antithrombotic Agents—A View on the Current Development. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23: 1109-1114.
- Baltia, R., Bougatef, A., Silaa, A., Guillochon, D., Dhulster, P., y Nedjar-Arroume, N. (2015) Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 170: 519-525.
- Benzie, I., y Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power". The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Bermudez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, M.T., y García-Conesa, M.T. (2007) Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry* 102: 865-874.
- Cushman, D.W., Cheung, H.B., Sabo, E.F., y Ondetti, M.A. (1977) Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl aminoacids. *Biochemistry* 16: 5484-5491.
- Dai, C., Zhang, W., He, R., Xiong, F., y Ma, H. (2017) Protein breakdown and release of antioxidant peptides during simulated gastrointestinal digestion and the absorption by everted intestinal sac of rapeseed proteins. *Food Science and Technology* 86: 424-429.
- Délano-Frier, J.P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P.A., y Herrera-Estrella, L. (2011) Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics* 12: 363–380.
- Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A., y Morales, F.J. (2005) Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 7832-7836.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., y Decker, E.A. (2008) Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 430-441.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., y Añón, M.C. (2011) Amaranth Seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry* 126: 878-884.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., y Recio, I. (2005) Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal* 17: 42-49.
- Khiri, Z., Rico, D., Martin-Diana, A.B., y Barry-Ryan, C. (2014) Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1663-1671.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Martínez, N.E., y Añón, C.M. (1996) Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 2523-2530.
- Mehta, A.Y., Jin, Y., y Desai, U.R. (2014) An update on recent patents on thrombin inhibitors (2010 -- 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24: 47-67.
- Mlakar, S.G., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., y Bavec, F. (2010) Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate. *Journal for Geography* 5: 135–146.
- Najafian, L., y Babji, A.S. (2014) Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification of antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods* 9: 280-289.
- Lo, W.M.Y., y Li-Chan, E.C.Y. (2005) Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 3369-3376.
- Orsini-Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M.C., y Torini, V.A. (2016) Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry* 197: 1160-1167.

- Orsini-Delgado, M.C., Tironi, V.A., y Añón, M.C. (2011) Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology* 44: 1752-1760.
- Parris, N., Moreau, R.A., Johnston, D.B., Dickey, L.C., y Aluko, E. (2008) Angiotensin I Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Commercial Wet and Dry Milled Corn Germ. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 2620-2623.
- Peña-Ramos, E., Xiong, Y., y Arteaga G. (2004) Fractionation and characterisation for antioxidant activity hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 1908-1918.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A., y Añón, M.C. (2015) Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Food Science and Technology* 60: 171-177.
- Sashidhar, R.B., Capoor, A.K., y Ramana, D. (1994) Quantification of epsilon-amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods* 167: 121-127.
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., y Ijiri, Y. (2009) Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides from pork meat. *Thrombosis Research* 123: 753-757
- Stadtman, R.E., y Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218.
- Udenigwe, C., y Aluko, R. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77: R11–R24.
- Vecchi, B., y Añón, M.C. (2009) ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry* 70: 864-870.
- Wattanasirithama, L., Theerakulkaita, C., Wickramasekara, S., Maierb, C.S., y Stevensc, J.F. (2016) Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry* 192: 156-162.
- World Health Organization (2017) Cardiovascular diseases. Available at http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/ (accessed 15 may 2017).
- Yang, W.G., Wang, Z., y Xu, S.Y. (2007) A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysates by microplate reader. *Chinese Chemical Letters* 18: 449-451.
- Zhang, B.S., Zhang, W., y Xu, S.Y. (2008) Antioxidant and antithrombotic activity of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 521-527.
- Zhang-Ji, Q., Yuang-Yuang, Z., Gun-Woo, O., Seong-Yeong, H., Won-Sun, P., y Il-Whan, C. (2018) Antioxidant and Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition Effects and Antihypertensive Effect in Spontaneously Hyertenisve Rats of Peptide Isolated from Boiled Abalone By-Products, Hallotis discus hannai. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 27: 946-960.

Capítulo 3 . Bioactividad de péptidos liberados durante fermentación láctica de proteínas de amaranto con potencial efecto protector cardiovascular.

RESUMEN

La fermentación ha demostrado ser una técnica eficaz en la liberación de péptidos bioactivos. Es por eso que en este estudio se evaluó la actividad antihipertensiva, antitrombótica y antioxidante durante la fermentación de las proteínas de amaranto con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* 54102 en mono cultivo y en cultivo combinado. Durante las fermentaciones se observó un aumento de los grupos amino libres y no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los monocultivos, a diferencia del cultivo combinado donde se obtuvo una mayor concentración. Este resultado se relacionó con las actividades antihipertensiv y antioxidante, donde también se encontraron los valores más altos en el cultivo combinado (45% de inhibición-ECA y 168 μmol ET/L para DPPH, 268 μmol ET/L para ABTS y 381 μmol E FeII/L para FRAP). Por otro lado, la actividad antitrombótica no tuvo una relación con la concentración de los grupos amino libres durante las fermentaciones, lo que resultó en la mayor actividad biológica en diferentes tiempos de fermentación en cada experimento. *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* 54102 son cepas capaces de liberar péptidos bioactivos de la proteína del amaranto, aunque el amaranto no es una matriz común para el desarrollo de bacterias de origen lácteo. La metodología propuesta en este estudio puede ser útil en el desarrollo de bebidas fermentadas, diferentes a la leche, para obtener un nuevo alimento funcional.

Palabras clave: proteína de amaranto, péptidos bioactivos, fermentación, bacterias lácticas.

ABSTRACT

Fermentation has shown to be an effective technique in bioactive peptides release. That is why in this study antihypertensive, antithrombotic and antioxidant activity was evaluated during amaranth proteins fermentation with *L. casei* Shirota and *S. thermophilus* 54102 in mono and combined culture. During fermentations an increase of free amine groups was observed, and no statistically differences among mono cultures was shown, getting higher concentration in combined culture. This was related with antihypertensive and antioxidant activities, where also the highest values were found in the combined process (45% of ACE-i, and 168 μmol TE/L for

DPPH, 268 $\mu\text{mol TE/L}$ for ABTS and 381 $\mu\text{mol FeII/L}$ for FRAP). On the other hand, antithrombotic activity was not related with free amine groups during fermentations, having the highest bioactivity in different moments in each experiment. *L. casei* Shirota and *S. thermophilus* 54102 are strains able to release bioactive peptides from amaranth protein, even though amaranth is not a common matrix for the development of lactic acid bacteria. In addition, in this study it was observed for the first time that lactic acid strains are able to release bioactive peptides from amaranth protein. Also, this methodology could be part for the development of fermented beverages different to fermented milks in order to diversify matrix to obtain a novel functional food.

Keywords: Amaranth protein, bioactive peptides, fermentation, acid lactic bacteria

INTRODUCCIÓN

El amaranto es una fuente valiosa de proteínas (entre 15 y 18%) para la nutrición humana con un perfil equilibrado de aminoácidos entre los que se encuentran la lisina, el triptófano y los aminoácidos azufrados. Estas características le permiten ser un precursor para la liberación de péptidos bioactivos que se encuentran encriptados en proteínas nativas, (Barba de la Rosa y col., 1992). Se ha reportado la liberación de péptidos antitrombóticos, antihipertensivos y antioxidantes de las proteínas de amaranto por digestión *in vitro* e hidrólisis enzimática (Tovar-Pérez y col., 2009; Orsini-Delgado y col., 2011; 2016; Sabbione y col., 2015), sin embargo, nunca se ha reportado sobre la fermentación de proteínas de amaranto para la producción de péptidos con bioactividad.

La fermentación es una técnica difundida a nivel mundial que se utiliza en el procesamiento de alimentos, que puede contribuir a su inocuidad y ofrece ventajas organolépticas, tecnológicas, y/o nutricionales; la leche es una de las principales fuentes para el desarrollo de este tipo de alimentos fermentados (Leroy y De Vuyst, 2004). Durante la fermentación, las estructuras de los activos biológicos encriptados en la proteína precursora pueden liberarse de sus formas inactivas (Agyei y Danquash, 2011). La longitud y las secuencias específicas de estos péptidos dependen de la proteína precursora y de las bacterias iniciadoras, ya que el sistema proteolítico es inherente a cada cepa bacteriana. Las bacterias iniciadoras más comunes son *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*, las cuales han demostrado su capacidad para liberar péptidos bioactivos de la leche (Inoue y col., 2003). Tal liberación es resultado del efecto que ejerce su

sistema proteolítico compuesto de proteinasas, peptidasas y un sistemas de transporte de péptidos que es vital para la nutrición bacteriana (Hebert y col., 2000).

Algunas de las actividades que han mostrado los péptidos liberados por este método son: a) antitrombótica, al inhibir la trombina de su interacción con la fibrina, para evitar la formación de coágulos sanguíneos (Scheraga, 2004); b) antihipertensiva, por inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA), lo cual se relaciona con el aumento concomitante en el nivel de bradiquinina, que produce una reducción general de la presión arterial (Donkor y col., 2007); y c) antioxidante, que previene la formación o contribuye a la degradación de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (Chang y col., 2013).

Por lo tanto, en este estudio, la fermentación se aplicó como un medio para producir inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I y trombina, así como la capacidad antioxidante proporcionada por los péptidos de las proteínas de amaranto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de proteína de amaranto.

Las semillas crudas de amaranto se obtuvieron de Xochimilco, Ciudad de México, en julio de 2016. Las semillas se molieron en un molino de Chopin, utilizando la fracción de sémola (tamaño de molécula entre 200 y 800 μm). La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología de Martínez y Añón (1996). La harina de amaranto fue desgrasada por 24 horas en n-hexano, en una solución peso/volumen 10 g/100mL. El hexano se retiró por filtración. El sólido obtenido se resuspendió en agua desionizada al 10% p/v y sometándolo a un pH alcalino (9) con NaOH 2 M durante 30 minutos para extraer la proteína. El extracto fue centrifugado (4°C, 10,000 rpm, 20 minutos). y del sobrenadante recuperado, se precipitó la proteína por modificación del pH a 5 con HCl 2M. Finalmente, la proteína obtenida se llevó a un pH neutro con una solución de NaOH, se liofilizó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Fermentación de la proteína del amaranto

Para las fermentaciones, las proteínas y la solución de glucosa, se pasteurizaron por separado y se mezclaron en condiciones estériles en una proporción de 8:2. La solución de proteína se preparó a 40 g/L y la solución de glucosa a 20 g/L, en agua desionizada. Las fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* 54102 se realizaron en monocultivo y en cultivo combinado durante 36 h. Los microorganismos seleccionados se agregaron al medio de

fermentación en condiciones estériles en una concentración de 6.5 log₁₀ CFU/mL para *L. casei* Shirota y 6.7 log₁₀ cfu/mL de *S. thermophilus* 54102 para monocultivos; y 3.2 log₁₀ CFU/ml y 3.3 log₁₀ CFU/ml, respectivamente, en el cultivo combinado. Una vez inoculado el medio de fermentación se incubó a 37°C durante 36 h. Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras de 1 mL cada 2 horas, que fueron centrifugadas y el sobrenadante se almacenó en congelación (-4°C) para el análisis de grado de hidrólisis y bioactividad.

Cuantificación del Grado de hidrólisis por TNBS

Para cuantificar el grado de hidrólisis medido como concentración de péptidos solubles durante la fermentación se utilizó el método de Sashidhar y col., (1995), con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS 5%, Sigma-Aldrich). La solución de TNBS se preparó utilizando tampón de fosfato (0.21 M; pH 8.2) en una concentración del 1% (v/v). La reacción se llevó a cabo mezclando 2 mL de solución de TNBS, 2 mL de tampón de fosfato y 0.250 mL de muestra a 50°C. Después de 60 minutos de reacción, se agregaron 2 mL de HCl 0.1 N para detener la reacción y la absorbancia fue leída a 340 nm. Los resultados que se obtuvieron se compararon con la recta de calibración de glicina construida con diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 mg / mL). Los resultados se expresaron como miligramos de grupos amino libres por litro (mg/L NH :-).

Determinación de la bioactividad

Actividad antihipertensiva

El efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (i-ECA) (EC 3.4.15.1, Sigma-Aldrich) se evaluó mediante la técnica espectrofotométrica según el método de Cushman y Cheung (1997), con modificaciones. El sustrato utilizado fue el Hippuril-Histidil-Leucina (HHL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) el cual fue disuelto en tampón de borato de sodio (0.1M, pH 8.3, con cloruro de sodio 0.3M) a una concentración de 5 mM. A la mezcla de reacción se le agregaron 10 µL de enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4.15.1, 5.1 U/mg; Sigma-Aldrich), 100 µL de sustrato y 40 µL de muestra y fue incubada durante 75 minutos a 37°C. El ácido hipúrico formado se extrajo con acetato de etilo, se resuspendió en agua desionizada y se midió a 220 nm, en un espectrómetro Power Wave XS UV-Biotek (software KC Junior, EE. UU.). La actividad inhibitoria de la ECA se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de actividad inhibitoria} = (\text{AbsC}-\text{AbsM})/(\text{AbsC}-\text{AbsB}) \times 100$$

Dónde:

AbsC = ácido hipúrico formado durante la acción de la ECA sin inhibidor

AbsB: Hippuril-histidil-leucina sin reaccionar que se ha extraído con acetato de etilo

AbsM: ácido hipúrico formado después de la acción de la ECA en presencia de una sustancia inhibidora.

Actividad antitrombótica

Para evaluar la actividad antitrombótica se utilizó el método de microplaca de Zhang y col., (2008). La trombina (150 UI/L; EC 3.4.15.1 Sigma Chemical Co.) y el fibrinógeno (Sigma Chemical Co.) se prepararon con tampón TRIS-HCl (0.05 M, pH 7.2 con NaCl 0.15M), a concentraciones finales de 12 UI/L y 0.10%, respectivamente. Se mezclaron 80 µL de muestra con 280 µL de fibrinógeno y se midió su absorbancia a 405 nm (SB). A esta mezcla se agregaron 20 µL de trombina y se midió la absorbancia después de 10 minutos de reacción a 37°C (S). El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-CB)-(S-SB)]/(C-CB)*100$$

Dónde:

CB (blanco de control): la absorbancia inicial del control negativo de inhibición.

C (control): la absorbancia del control negativo a los 10 minutos de incubación con trombina.

SB (muestra en blanco): La absorbancia inicial de la muestra.

S (muestra): la absorbancia de la muestra a los 10 minutos de incubación con trombina.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante tres métodos.

ABTS

La capacidad antirradical se midió con el catión radical ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS • +; Sigma-Aldrich). Se preparó ABTS a una concentración de 7 mM/L con 2,45 mM/L de persulfato de potasio (Sigma-Aldrich), la mezcla se llevó a incubación durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se diluyó hasta alcanzar una absorbancia de 0.7±0.01. La cuantificación de la capacidad antirradical se llevó a cabo a partir de la mezcla de 980 µL de la solución ABTS•+ con 20 µL de muestra, se mantuvo a temperatura ambiente durante 7 minutos y se midió la absorbancia a 754 nm. Los resultados se compararon con una línea de

calibración de Trolox y la capacidad antioxidante se expresó como mg de equivalentes de Trolox por litro (mg ET/L) (Delgado-Andrade y col., 2005).

DPPH

La actividad antirradical se cuantificó con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH ●; Sigma-Aldrich) al 0.07% en etanol. Para la reacción se mezclaron 100 µL de muestra con 500 µL de solución de DPPH●, se dejó a temperatura ambiente durante 1 h y se midió su absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas. Se construyó la curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de Trolox por litro (mg ET/L) (Delgado-Andrade y col., 2005).

FRAP

La actividad antioxidante de FRAP se cuantificó de acuerdo con la metodología de Benzie y Strain (1996). La solución de FRAP se preparó en un tampón de acetato (0,3 M, pH 3,6), FeCl₃ (20 mM en HCl 40 mM) y TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina) (10 mM en HCl 40 mM), en una proporción de 10:1:1. Para la reacción se mezclaron 30 µL de muestra, 900 µL de solución FRAP y 90 µL de agua destilada. Al mismo tiempo, se hizo una curva estándar con FeSO₄ (Fe²⁺) a diferentes concentraciones. Las lecturas de la absorbancia se hicieron a 593 nm y la actividad antioxidante se expresó como micromol equivalentes de Fe (II) por 100 g (µmol E Fe (II)/100 g).

Análisis estadístico

Todos los valores se obtuvieron por triplicado y se calculó la desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (SPSS® para WINTM versión 15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad proteolítica

La concentración de grupos amino libres se evaluó para conocer el grado hidrolítico durante la fermentación. En la figura 3.1, se puede observar la concentración de grupos amino libres durante la fermentación realizada con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* 54102 en monocultivo. La concentración de grupos amino libres fue ligeramente mayor en la fermentación de *L. casei* que en la de *S. thermophilus* (1945±77.78 y 1645±63.63 mg/L NH: -, respectivamente). Por otro lado,

cuando la fermentación se realizó en un cultivo combinado, los grupos amino libres alcanzaron la concentración más alta ($4245 \pm 35.35\text{mg/L NH}^-$:-).

Las diferencias de concentración de los grupos amino libres entre ambos microorganismos podrían estar relacionadas con la de las enzimas de cada sistema proteolítico. De entrada, la proteinasa unida a la pared celular es diferente en cada bacteria; por ejemplo la PrtP se inserta en el sistema de lactobacilos y la PrtS se encuentra en estreptococos (Siezen y col., 2005; Rodríguez-Serrano y col., 2018), cada uno realiza diferentes cortes determinados por su especificidad. También los miembros de las superfamilias PepE/PepG (endopeptidasas) y PepI/PepR/PepL (prolina peptidasas), enzimas relacionadas con los péptidos bioactivos liberados, están ausentes en los estreptococos (Siezen y col., 2005; Liu y col., 2010; Rodríguez-Serrano y col., 2018). Esto explica la mayor concentración de grupos amino libres en la fermentación realizada con *Lactobacillus casei* comparado con los resultados observados en la fermentación con estreptococos.

Como se ha mencionado, el cultivo combinado obtuvo la mayor concentración de grupos amino libres. En otros estudios, se ha reportado que las fermentaciones realizadas en combinación de *S. thermophilus* y diferentes cepas de lactobacilos, estimulan el crecimiento mutuo mediante el intercambio de metabolitos como péptidos, ácido fólico y dióxido de carbono (Sander-Siewewerts y col., 2010), lo que puede resultar en una mayor actividad proteolítica. Además, durante la cuenta viable de bacterias, el cultivo combinado mostró la mayor viabilidad (material complementario 3.1).

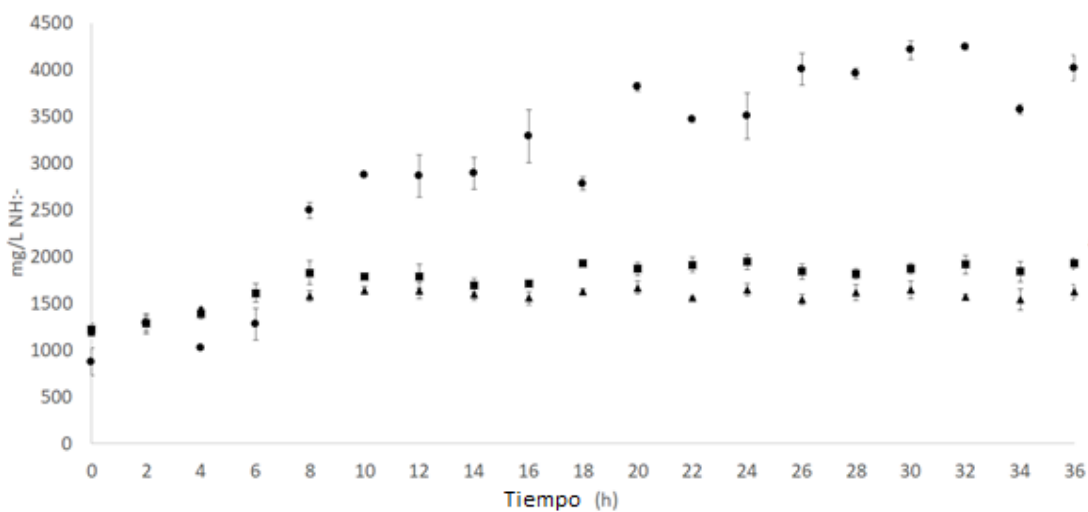


Figura 3.1. Concentración de grupos amino libres.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre procesos. ▲ *S. thermophilus* 54102; ■ *L. casei* Shirota. ● *L. casei* Shirota and *S. thermophilus* 54102.

Estudios de bioactividad *in vitro*.

Se midieron las bioactividades de todas las muestras tomadas durante la fermentación. Sin embargo, debido a la cantidad de datos obtenidos, solo se muestra el tiempo en que se obtuvo la mayor actividad biológica (tablas 3.1 y 3.2).

Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina e inhibición de trombina

La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (i- ECA) ha sido reportada en varios estudios en los que la fuente principal de proteínas ha sido la leche, con actividad inhibitoria superior al 90% en fermentaciones con *L. casei* Shirota YIT 9029 (González-González y col., 2011). Nuestros resultados mostraron (Tabla 3.1) una mayor actividad inhibitoria cuando la fermentación se llevó a cabo en cultivo combinado de ambos microorganismos a las 36 horas de proceso ($45.22 \pm 0.28\%$). Estos resultados se relacionaron con la concentración de grupos amino libre, ya que a mayor concentración de grupos amino, mayor actividad antihipertensiva (material complementario 3.2). Diferentes autores han reportado la relación entre el grado de hidrólisis y la mayor actividad antihipertensiva, donde se ha demostrado que los péptidos más pequeños tuvieron una mayor inhibición de la ECA (Korhonen y Pihlanto, 2006; Lee y Hur, 2017). Cabe señalar que las leches fermentadas con diferentes cepas de bacterias ácido lácticas pueden contener una variedad más amplia de sustancias funcionales que la leche inoculada con una sola cepa (Elkhtab y col., 2017), esas sustancias podrían ser péptidos liberados durante el proceso de fermentación, lo que podría explicar una mayor inhibición de la i-ECA en el cultivo combinado. El tamaño, la cadena aminoacídica y la función de los péptidos producidos están influenciados por las condiciones de fermentación y la fuente de proteínas (Toldrá y col., 2018). Esto podría explicar la baja actividad de i-ECA en el presente estudio en comparación con la actividad demostrada para los péptidos derivados de la leche. Además, otra característica de los péptidos i-ECA de la leche es que generalmente presentan un residuo de prolina en el terminal-C. En contraste, las proteínas del amaranto presentan una baja concentración de prolina (4%) en su estructura primaria (Pisarikova y col., 2005).

Por otro lado, en este estudio se observó que la mayor actividad antitrombótica en cada sistema de fermentación se alcanzó en diferentes tiempos (Tabla 3.1); mientras que la mayor actividad antitrombótica se alcanzó en la hora 8 para *S. thermophilus*, la fermentación con *L. casei* alcanzó la mayor actividad en la hora 16 y el sistema combinado la mostró en la hora 32. Este

comportamiento fue diferente al observado para la actividad antihipertensiva. Además, durante todas las fermentaciones se observaron incrementos seguidos por disminuciones de los porcentajes de inhibición (material complementario 3.2). Pérez-Escalante y col., (2018) mostraron un comportamiento similar al obtenido en el presente trabajo con la actividad antitrombótica obtenida durante la fermentación de leche con *Lactobacillus casei*. Esto puede explicarse por la especificidad del sistema proteolítico de cada cepa, que conduce a la liberación de una estructura peptídica capaces de inhibir a la trombina (Siezen y col., 2005; Rodríguez-Serrano y col., 2018; Liu y col., 2010). El sistema proteolítico tiene particularidades entre bacterias ácido lácticas, lo que podría resultar en la aparición y desaparición de algunos péptidos con actividad inhibitoria de la trombina (Gasson y de Vos, 1994). Este comportamiento ha sido explicado por Gasson y de Vos (1994) los cuales lo nombraron patrón de cascada. Las principales diferencias se incluyen en los sistemas de transporte de di- y tri-péptidos (Dpp y DtpT en *Lactobacillus* y Dpp en *Streptococcus*), y el sistema de oligopeptidos (sistema Opp en *Lactobacillus* y sistema Ami en *Streptococcus*) (Kunji y col., 1996; Hols y col., 2005; Ha y col., 2015). También la actividad antitrombótica está relacionada con su estructura, dicha estructura podría estar relacionada con su afinidad con el sitio activo o exositos de la trombina (Pérez-Escalante y col., 2018).

Tabla 3.1. Inhibición de ECA y Trombina

Proteína no fermentada	ECA		Trombina	
	Tiempo (h)	% de inhibición	Tiempo (h)	% de inhibición
		8.17±1.40		4.87±2.43
Bacteria	Tiempo (h)	% de inhibición	Tiempo (h)	% de inhibición
<i>L. casei</i> Shirota	34	38.38 ±0.98 ^{ab}	16	85.46±3.01 ^b
<i>S. thermophilus</i> 54102	32	36.14±1.32 ^a	8	75.60±4.87 ^a
Combinado	36	45.22±0.28 ^b	32	93.49±3.75 ^c

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre procesos.

Actividad antioxidante

En la tabla 3.2 se observa la actividad antioxidante medida por los métodos de DPPH, ABTS y FRAP. El cultivo combinado mostró la mayor actividad antioxidante en los tres ensayos. Además, se puede observar que *L. casei* Shirota y la fermentación combinada mostraron la mayor actividad antioxidante en el mismo tiempo en las tres actividades (hora 20 y 26; respectivamente), mientras que la fermentación de *S. thermophilus* 54102 tuvo una actividad antioxidante máxima diferente en tiempos diferentes (material complementario 3.3). Aunque, al igual que en la actividad

antitrombótica. Estos resultados corresponden a aquellos reportados por Ha y col., (2016) y Zou y col., (2016) quienes encontraron que la actividad antioxidante depende de factores como el peso molecular, la composición de aminoácidos y su secuencia, donde la mayor actividad la encontraron en péptidos con menos de 20 residuos aminoácidos (peso molecular <3000 Da), mientras que la mayor actividad antioxidante la obtuvieron en muestras con mayor cantidad de grupos amino libres. Sin embargo, Ren y col., (2007) reportaron una mayor actividad antioxidante en péptidos con un peso molecular superior a 4000 Da. La presencia de diferentes péptidos que actúan por diferentes mecanismos y así como las características del sistema proteolítico (corte por aminopeptidasas intracelulares) explica las diferencias observadas en las actividades antioxidantes evaluadas (Sarmadi y col., 2010). Además, se ha encontrado que aminoácidos libres pueden mejorar la actividad antioxidante, como los aminoácidos nucleófilos con azufre (Cys y Met) y aquellos con anillos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) o imidazol (His) (Virtanen y col., 2007; Sarmadi y col., 2010).

Tabla 3.2. Actividad antioxidante

Proteína fermentada	no	DPPH		ABTS		FRAP	
		Tiempo	μmol TE/mL	Tiempo	μmol TE/mL	Tiempo	μmoleFell/mL
<i>L. casei</i> Shirota		20	109.9±7.3 ^a	20	194.5±5.9 ^b	20	316.3±35.1 ^b
<i>S. thermophilus</i>		20	104.1±9.7 ^a	34	103.9±10 ^a	10	225.6±19.6 ^a
Cultivo combinado		26	168.1±5.7 ^b	26	268.4±11.8 ^c	26	381.3±0.6 ^c

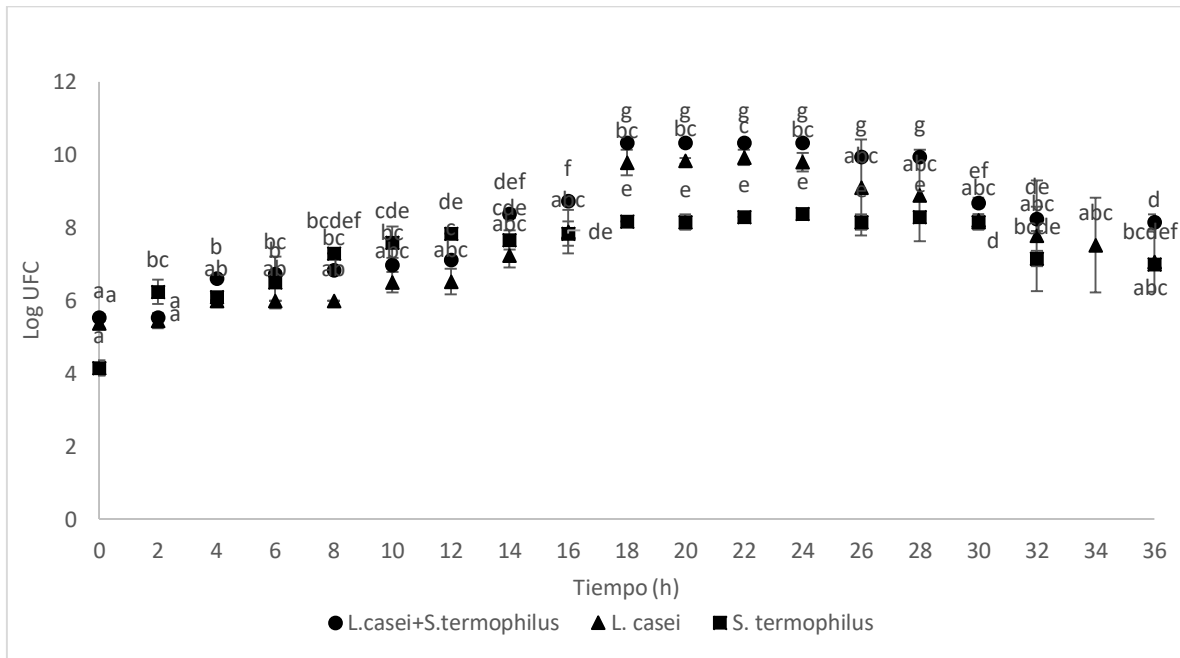
Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre procesos.

CONCLUSIONES

Las proteínas del amaranto son una fuente potencial para la liberación péptidos con actividad antihipertensiva, antitrombótica y antioxidante; mediante el uso de bacterias ácido lácticas. Una fermentación con cultivo combinado, en específico con el uso de *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* 54102 alcanza mayores bioactividades (antioxidantes, antihipertensivas y antitrombóticas) que las mismas cepas en monocultivos, concluyendo que existe una relación entre los sistemas proteolíticos que participan en cooperación simbiótica durante la fermentación y la proteína utilizada. Esto muestra que la proteína de amaranto puede funcionar como sustrato para bacterias ácido lácticas, y ser una fuente de péptidos bioactivos, lo que convierte a la fermentación en un

nuevo mecanismo para la liberación de péptidos a partir de proteínas de amaranto, que pueden prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares.

MATERIAL COMPLEMENTARIO



Material complementario 3.1. Cuenta Viable durante fermentación de proteína de Amaranto.

Material complementario 3.2 Inhibición de trombina y Enzima Convertidora de Angiotensina durante la fermentación de proteína de amaranto.

Tiempo	Enzima Convertidora de Angiotensina			Trombina		
	<i>L. casei</i>	<i>S. termophilus</i>	Combinado	<i>L. casei</i>	<i>S. termophilus</i>	Combinado
0	8.77±1.40 ^a	8.17±0.56 ^a	10.82±1.82 ^a	8.94±3.72 ^a	7.31±4.87 ^a	3.25±1.40 ^a
2	8.17±1.12 ^a	16.29±1.40 ^b	8.84±3.37 ^b	29.26±2.43 ^{abcd}	14.63±2.43 ^{ab}	7.31±4.87 ^{ab}
4	8.70±0.56 ^{ab}	19.28±2.95 ^{bc}	10.20±2.10 ^{bc}	17.88±7.84 ^{ab}	7.31±4.87 ^a	33.33±6.13 ^{bcde}
6	8.98±0.84 ^{ab}	19.66±2.52 ^{bc}	12.21±2.66 ^{bcd}	20.32±2.81 ^{abc}	32.52±7.84 ^{bc}	42.27±3.72 ^{ef}
8	11.23±0.84 ^{bc}	21.34±1.96 ^{cd}	14.55±1.77 ^{cde}	49.59±13.43 ^{defg}	75.60±0 ^g	78.04±9.75 ^{gh}
10	12.82±0.16 ^{bc}	22.75±1.68 ^{cde}	17.50±1.97 ^{def}	75.60±0 ^{hij}	56.09±3.69 ^{de}	78.04±17.07 ^{gh}
12	15.35±0.98 ^c	25.18±0.42 ^{def}	18.49±1.93 ^{efg}	57.72±3.72 ^{efgh}	34.14±4.87 ^{bc}	43.08±15.86 ^{ef}
14	21.25±0.16 ^d	26.87±1.54 ^{efg}	19.38±1.28 ^{efgh}	41.46±4.87 ^{cdef}	43.90±9.75 ^{cd}	60.97±2.07 ^{fg}
16	23.31±0.84 ^d	26.87±1.54 ^{efg}	22.09±1.78 ^{fgh}	85.36±3.01 ^j	60.97±0 ^{cde}	38.21±6.13 ^{d^{ef}}
18	25±0.28 ^{de}	27.43±1.26 ^{efg}	23.26±1.85 ^{ghij}	70.73±12.19 ^{ghij}	40.65±8.56 ^{bc}	34.14±2.49 ^{cde}
20	25.46±0.16 ^{de}	28.55±1.82 ^{fg}	24.43±1.40 ^{hij}	59.34±8.56 ^{efghi}	70.73±12.19 ^g	14.63±2.43 ^{abcd}
22	27.99±0.70 ^{ef}	29.96±1.54 ^g	25.42±1.72 ^{ij}	36.58±4.87 ^{bcde}	68.29±4.87 ^{defg}	11.38±7.84 ^{abc}
24	28.93±0.56 ^{efg}	36.98±1.82 ^h	27.29±0.82 ^{ijk}	61.78±3.72 ^{fghi}	60.97±14.63 ^{cdef}	48.78±4.87 ^{ef}
26	30.05±1.12 ^{fgh}	36.32±1.135 ^h	28.79±1.82 ^{jk}	80.48±6.45 ^{hij}	44.71±3.72 ^{bc}	25.20±1.40 ^{abcde}
28	32.49±2.66 ^{ghi}	35.86±0.85 ^h	32.11±1.87 ^{kl}	69.91±7.45 ^{cdef}	68.29±8.79 ^{cdef}	33.33±15.48 ^{bcde}
30	33.70±2.80 ^h	36.23±0 ^h	36.28±1.48 ^{lm}	47.96±11.52 ^{defg}	27.64±1.40 ^{ab}	48.78±14.83 ^{ef}
32	36.14±2.95 ^{ij}	36.61±1.32 ^h	39.46±0.42 ^m	17.07±10.63 ^{ab}	52.03±8.56 ^{bcd}	93.49±3.72 ^h
34	38.38±0.98 ^j	36.14±0.98 ^h	41.43±1.70 ^m	82.11±8.56 ^j	66.66±7.45 ^{cdef}	28.94±2.76 ^{bcde}
36	36.07±2.14 ^{ij}	36.14±0.98 ^h	45.22±0.280 ⁿ	69.91±10.99 ^{ghij}	56.09±7.31 ^{cdef}	85.36±8.79 ^h

Material complementario 3.3 Actividad antioxidante durante fermentación de proteína de amaranto.

Tiempo	DPPH			ABTS			FRAP		
	<i>L. casei</i>	<i>S. termophilus</i>	Combinado	<i>L. casei</i>	<i>S. termophilus</i>	Combinado	<i>L. casei</i>	<i>S. termophilus</i>	Combinado
0	38.04±3.81 ^a	42.93±5.25 ^a	25.33±2.08 ^a	54.21±3.19 ^a	24.81±0.90 ^a	24.81±3.63 ^a	145.66±3.30 ^{abc}	139.89±3.30 ^{abc}	110.60±0.71 ^a
2	66.27±7.55 ^{cd}	42.93±7.26 ^a	49.81±7.83 ^b	51.18±24.54 ^a	24.81±3.63 ^a	29.96±3.19 ^a	142.62±4.01 ^{ab}	130.42±2.32 ^{ab}	185.25±2.32 ^b
4	46.47±3.44 ^b	35.22±8.28 ^a	56.47±3.75 ^b	82.69±8.64 ^{ab}	29.96±3.19 ^{ab}	31.78±6.82 ^{ab}	134.41±1.07 ^{ab}	127.03±1.07 ^{ab}	184.53±16.60 ^b
6	70.33±13.75 ^{cd}	59.70±5.15 ^b	56.06±1.87 ^b	144.51±18.63 ^{cde}	35.42±15.91 ^{ab}	47.54±4.84 ^{abc}	282.03±1.42 ^{bcde}	118.82±0.35 ^a	212.39±2.32 ^{cd}
8	61.27±5.31 ^{bc}	73.04±5.08 ^{bc}	111.16±20.09 ^{de}	153.90±4.54 ^{def}	31.78±15.00 ^{ab}	54.81±9.09 ^{abcd}	289.17±1.42 ^{bcde}	202.75±1.42 ^{ef}	209.53±5.35 ^{ef}
10	84.39±2.38 ^{def}	75.85±0.18 ^b	80.64±2.50 ^c	138.15±22.27 ^{cde}	35.72±6.36 ^{ab}	53.90±17.27 ^{abcd}	289.53±11.60 ^{bcdefg}	225.60±19.64 ^f	213.10±3.03 ^{cd}
12	87.83±4.80 ^{efg}	85.85±5.31 ^{bd}	81.89±1.72 ^c	155.42±3.19 ^{def}	29.06±10.05 ^{ab}	79.06±13.18 ^{bcd}	260.25±1.07 ^f	124.89±2.32 ^{ab}	267.39±1.42 ^f
14	100.22±8.97 ^{fgh}	94.39±5.31 ^{de}	93.87±2.35 ^{de}	157.54±18.18 ^{defg}	36.33±15.00 ^{ab}	86.63±7.27 ^{cd}	279.17±6.07 ^{bcd}	127.92±8.03 ^{ab}	292.03±1.07 ^g
16	106.68±2.72 ^{gh}	98.66±4.63 ^{de}	122.20±1.57 ^e	133.60±4.09 ^{cde}	35.42±14.09 ^{ab}	86.33±2.28 ^{cd}	287.39±14.64 ^{bcde}	161.14±9.37 ^{cd}	299.89±8.03 ^g
18	102.20±5.48 ^{fg}	97.10±6.26 ^{de}	177.72±3.03 ^g	157.24±24.09 ^{defg}	56.63±9.09 ^{abc}	89.36±2.72 ^{cd}	276.67±1.42 ^{bcd}	141.14±3.30 ^{abc}	375.96±0.71 ^{ijk}
20	109.91±7.34 ^h	104.18±9.70 ^e	164.70±4.55 ^{fg}	194.51±5.91 ^g	62.09±17.27 ^{abc}	98.15±5.91 ^{de}	316.32±35.17 ^{efgh}	150.96±21.96 ^{bcd}	362.75±1.48 ⁱ
22	107.62±2.18 ^h	101.89±3.44 ^{de}	164.70±4.12 ^{fg}	192.09±1.81 ^{fg}	44.51±9.54 ^{ab}	141.18±6.36 ^e	342.03±6.25 ^h	135.78±2.05 ^{abc}	368.10±4.82 ^{ij}
24	103.97±9.79 ^{fgh}	100.75±2.04 ^{de}	173.45±3.00 ^g	164.51±1.38 ^{efg}	45.42±12.27 ^{ab}	240.27±12.72 ^f	304.89±16.60 ^{ecdfg}	141.67±22.23 ^{bcd}	379.25±1.78 ^k
26	106.79±4.19 ^{gh}	97.62±7.06 ^{de}	168.14±5.79 ^{fg}	132.69±0.52 ^{cde}	49.36±13.63 ^{ab}	268.45±11.81 ^f	313.46±12.85 ^{defgh}	150.60±1.42 ^{bcd}	381.32±6.96 ^{jk}
28	109.70±2.62 ^h	98.87±3.26 ^{de}	163.97±7.19 ^{fg}	121.18±11.81 ^{cd}	58.45±9.09 ^{abc}	267.54±5.45 ^f	308.46±10.17 ^{defgh}	161.32±4.28 ^{cd}	342.39±5.71 ^h
30	106.68±1.73 ^{gh}	100.33±4.84 ^{de}	150.85±1.30 ^f	164.51±6.82 ^{efg}	65.72±14.54 ^{abc}	249.06±16.82 ^f	312.39±13.75 ^{defgh}	119.17±1.07 ^a	239.53±6.78 ^e
32	95.75±8.63 ^{fgh}	103.97±1.47 ^e	160.12±0.62 ^{fg}	116.63±7.27 ^{bc}	61.78±23.18 ^{abc}	236.63±20.90 ^f	315.96±16.96 ^{defgh}	179±0.62 ^{de}	228.10±0.89 ^{de}
34	94.60±1.90 ^{fgh}	102.33±2.03 ^e	117.83±5.59 ^{fg}	143.60±9.54 ^{cde}	103.90±10 ^e	225.68±16.79 ^{ef}	306.32±4.82 ^{efgh}	120.78±4.73 ^a	242.03±45.17 ^e
36	98.87±7.86 ^{fgh}	99.08±1.83 ^{de}	109.29±4.68 ^{de}	141.18±9.09 ^{cde}	85.72±16.36 ^d	225.72±0.90 ^{ef}	270.96±2.32 ^{fg}	113.64±2.05 ^a	273.82±4.64 ^{fg}

REFERENCIAS

- Agyei, D., y Danquah, M.K. (2011) Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 29: 272-77.
- Barba de la Rosa, A.P., Gueguen, J., Paredes-López, O., y Viroben, G. (1992) Fractionation Procedures, Electrophoretic Characterization and Amino Acid Composition of Amaranth Seed Proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 931-936.
- Benzie, I., y Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power". The FRAP assay. *Annals of Clinical Biochemistry* 239: 70-76.
- Chang, O.K., Seol, K.H., Jeong, S.G., Oh, M.H., Park, B.Y., Perrin, C., y Ham, J.S. (2013) Casein hydrolysis by bifidobacterium longum KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science* 96: 5544-5555.
- Cushman, D.W., Cheung, H.B., Sabo, E.F., y Ondetti, M.A. (1977) Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl aminoacids. *Biochemistry* 16: 5484-5491.
- Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A., Morales, F.J. (2005) Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 7832-7836.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T., y Shah, N.P. (2007) ACE inhibitory probiotic yoghurt. *International Dairy Journal* 17: 1321-1331.
- Elkhtab, E., El-Alfy, M., Shennana, M., Mohamed, A., y Yousef, A. (2017) New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kobucha cultures. *Journal of Dairy Science* 100: 9508-9520.
- Gasson, M.J., y de Vos, W.M. (1994) The proteolytic system of lactic acid bacteria. In: Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria, Chapter 4 (Gasson MJ, de Vos WM, Eds.) London: Blackie Academic & Professional/Chapman & Hall, pp. 169-210.
- González-González, C.R., Tuohy, K.M., y Jauregi, P. (2011) Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 21: 615-622.
- Ha, G.E., Chang, O.K., Han, G.S., Ham, J.S., Partk, B.Y., y Jeong, S.G. (2015) Comparison of Antioxidant Activities of Hydrolysates of Domestic and Imported Skim Milk Powder Treated with Papain. *J Food Science and Animal Resources* 35: 360-369.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., y Savoy de Giori, G. (2000) Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Applied Environmental Microbiology* 66: 5316-5321.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Guédon, S.D.E.E., Monnet, V., Renault, P., y Kleerebezem, M. (2005) New insight in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Revision* 29: 435-463.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., y Sansawa, H. (2003) Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition* 57: 490-495.
- Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945-960.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., y Konings, W.N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 70: 187-221.
- Lee, S.Y., y Hur, S.J. (2017) Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry* 228: 506-517.
- Leroy, F., y De Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15: 67-78.
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., y Su, J. (2013) Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science* 96: 4242-4251.
- Liu, M., Bayjanov, R.J., Renckens, B., Nauta, A., y Siezen, R.J. (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Medical Genomics* 11: 36-41.
- Martínez, N.E., y Añón, C.M. (1996) Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 2523-2530.
- Orsini-Delgado, M.C., Tironi, V.A., y Añón, M.C. (2011) Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*; 44: 1752-1760.

- Orsini-Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M.C., y Torini, V.A. (2016) Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry* 197: 1160-1167.
- Rodríguez-Serrano, G.M., García-Garibay, M., Cruz-Guerrero, A.E., Gómez-Ruiz, L., Ayala-Niño, A., Castañeda-Ovando, A., y González-Olivares, L.G. (2018) Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiological Biotechnology* 28: 1581-1588.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A., y Añón, M.C. (2015) Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology* 60: 171-177.
- Sashidhar, R.B., Capoor, A.K., y Ramana, D. (1995) Quantification of amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods* 167: 121-127.
- Scheraga, H.A. (2004) The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophysical Chemistry* 112: 117-130.
- Siezen, R.J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., y de Vos, W.M. (2005) Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Applied Environmental Microbiology* 71: 8371-8382.
- Tovar-Pérez, E.G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., y Soriano-Santos, J. (2009) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth gran. *Food Chemistry* 116: 437-444.
- Pérez-Escalante, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Añorve-Morga, J., y González-Olivares L.G. (2018) Antithrombotic Activity of Milk Protein Hydrolysates by Lactic Acid Bacteria Isolated from Commercial Fermented Milks. *Brazilian Archives of Biological Technology* 61: 1-10.
- Písaříková, B., Kráčmar, S., y Herzig, I. (2005) Amino acids contents and biological value of protein in various amaranth species. *Czech Journal of Animal Science* 50: 169-174.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., y Xue, S.J. (2008) Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* 108: 727-736.
- Sander-Sieuwert, S., Molenaar, D., van Hijum, S.A.F.T., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., de Bok, F.A.M., de Vos, W.M., y van Hylckama-Vlieg, J.E.T. (2010) Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied Environmental Microbiology* 76: 7775-7784.
- Sarmadi, B.H., e Ismail, A. (2010) Antioxidant peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31: 1949-1956.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.C., y Mora, L. (2018) Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry* 267: 395-404.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., y Korhonen, H. (2007) Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 102: 106-115.
- Zhang, B.S., Zhang, W., y Xu, S.Y. (2008) Antioxidant and antithrombotic activity of raeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 521-527.
- Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., y Xia, W.Q. (2016) The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules* 2016; 12: 1-14.

Capítulo 4 . Identificación de péptidos bioactivos derivados de proteínas hidrolizadas por un proceso enzimático de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

RESUMEN

En la última década se han centrado las investigaciones en los alimentos protéicos como fuente de secuencias peptídicas con actividad biológica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue hidrolizar, separar e identificar los péptidos bioactivos de las proteínas de *Amaranthus hypochondriacus*, una semilla latinoamericana con alto valor proteico. Las proteínas del amaranto se hidrolizaron usando Alcalase y Flavourzyme, por separado y en secuencia. Se midieron las bioactividades de los tres hidrolizados, encontrando valores mayores en el proceso secuenciado. Las fracciones de este hidrolizado se separaron por RP-HPLC y se analizó su capacidad biológica. Dos fracciones fueron identificadas con mayor bioactividad: i- ECA IC₅₀: 0.158 y 0.134; inhibición de trombina IC₅₀: 167 y 155; ABTS SC₅₀: 1.375 y 0.992 mg/L. Las fracciones se secuenciaron por medio de MALDI-TOF, encontrando cadenas de aminoácidos que no han sido reportadas como bioactivas. Se realizó la comparación bibliográfica, encontrando similitudes con los péptidos reportados en el amaranto y otras proteínas. En conclusión, las proteínas de amaranto son una fuente potencial de péptidos con capacidad multifuncional.

Palabras clave: proteína de amaranto; flavourzyme; alcalase péptidos bioactivos; hidrolizados.

ABSTRACT

Research in the last decade has been focused on food as source of peptidic sequences with biological activity. Thus, the objective of this study was to separate and identify bioactive peptides of *Amaranthus hypochondriacus* proteins, a Latin American seed with high protein value. Amaranth proteins were hydrolyzed using Alcalase and Flavourzyme, separated and in sequence processes. Bioactivities of the three hydrolysates were measured, finding greater values in the sequenced process. Fractions of this hydrolysate were separated by RP-HPLC and their biological capacity were analyzed. Two fractions got highest bioactivities ACE IC₅₀: 0.158 and 0.134; thrombin IC₅₀: 167 and 155; ABTS SC₅₀: 1.375 and 0.992 mg/L; respectively, and were sequenced by means of MALDI-TOF, finding amino acid chains which have not been reported as bioactive. Bibliographic comparisons were realized, finding similarities with peptides reported in amaranth

and other proteins. In conclusion, amaranth proteins are potential source of peptides with multifunctional capacity.

Keywords: Amaranth protein; flavourzyme; alcalase; bioactive peptides; hydrolysates.

INTRODUCCIÓN

Muchas enfermedades que prevalecen en la actualidad, podrían minimizarse e incluso prevenirse mediante la combinación de una dieta saludable y una ingesta de alimentos funcionales (Jew y col., 2009). Algunos componentes funcionales podrían ser moléculas como péptidos bioactivos, que generalmente son secuencias cortas cifradas en proteínas de alimentos (Udinigwe y col., 2012). Los péptidos bioactivos se liberan de las proteínas de los alimentos debido a la acción del metabolismo de los microorganismos durante la fermentación, el uso de enzimas proteolíticas o la acción de las enzimas gastrointestinales una vez que se ingieren las proteínas. El uso de enzimas comerciales es un método simple y económico para obtener aminoácidos y péptidos libres a partir de la hidrólisis de proteínas (Mazorra-Manzano y col., 2018).

Debido a esto, se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la preparación de hidrolizados a partir de diferentes fuentes de proteínas como cereales y pseudocereales, utilizando diferentes proteinasas en un esfuerzo por obtener biopéptidos altamente activos (Wattanasirithama y col., 2016; Najafian y Babji, 2014; Baltia y col., 2015; Raikos y Dassios, 2014). Una de las semillas originales mesoamericanas más importantes con un alto porcentaje de proteínas y un excelente equilibrio de aminoácidos es el amaranto. En México, el amaranto se consume en forma fresca, en dulces típicos y platos tradicionales (Tovar, 2018). Por su alto contenido en proteínas, el amaranto es una buena fuente de péptidos bioactivos con diversas actividades biológicas comprobadas, como lo son anticolesterolémicas, antihipertensivas, antioxidantes y antitrombóticas, que se han liberado principalmente mediante digestión *in vitro* (Mendonça y col., 2009; Tovar-Pérez y col., 2009; Orsini-Delgado y col., 2011; Sabbione y col., 2015).

Para conocer las secuencias de péptidos con actividades antitrombóticas, antihipertensivas y antioxidantes, el objetivo de este proyecto fue separar e identificar estas cadenas de péptidos de la proteína de amaranto, liberados durante la hidrólisis con dos enzimas comerciales: alcalase y flavourzyme, mediante hidrólisis separada y continua.

Metodología

Muestra y tratamientos

Las semillas crudas de amaranto se obtuvieron de Xochimilco, Ciudad de México, en julio de 2016. Las semillas se molieron en un molino de Chopin, separando y utilizando la fracción de sémola (tamaño de la molécula entre 200 y 800 μm). La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología de Martínez y Añón (1996) con algunas modificaciones. En una primera etapa, la harina se desengrasó con n-hexano (10% p/v) durante 24 h. Una vez desengrasada la harina, se suspendió en agua desionizada al 10% p/v y el pH se ajustó a 9 con NaOH, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 10000 rpm y la proteína del sobrenadante se precipitó por acidificación del medio a pH 5 con HCl. Se centrifugó durante 20 minutos a 10000 rpm y el sedimento se ajustó a un pH neutro, se liofilizó y se almacenó a 4 ° C hasta su uso. Esta proteína fue llamada extracto de proteína.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó según Tironi y Añón (2010). Cinco gramos de extracto de proteína se diluyeron en 100 ml de agua desionizada (milli Q 18.2 M Ω * cm). La proteína se hidrolizó mediante un proceso enzimático con las especificaciones que se indican para cada enzima. Para la hidrólisis de alcalase (H1), la solución se ajustó a pH 10, se añadió alcalasa (≥ 2.4 U/g, unidades Anson; Sigma-Aldrich) en una proporción de 8 $\mu\text{L}/100$ mg de extracto de proteína. Para la hidrólisis con flavourzyme (H2), la solución se ajustó a pH 7 y se añadió flavourzyme (≥ 500 U/g; Sigma Aldrich) en una proporción de 5 $\mu\text{L}/100$ mg de extracto de proteína. Para el uso de ambas enzimas en un proceso de hidrólisis continua (H3), después de dos horas de reacción con alcalasa, la reacción se detuvo calentando a 85 ° C durante 10 minutos, la misma solución se ajustó a pH 7, para enseguida añadir flavourzyme en las condiciones antes descritas. Para los tres métodos, se siguió la hidrólisis durante 4 horas, tomando muestras cada 20 minutos. Cada muestra se sometió a 85 ° C durante 10 minutos para detener la reacción, y estas fueron mantenidas en congelación hasta su uso.

Capacidad proteolítica mediante la prueba de TNBS.

Con el fin de determinar los grupos amino libres, la prueba del ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) se realizó de acuerdo con Sashidhar y col., (1995) con algunas modificaciones. Se preparó TNBS (5%; Sigma-Aldrich) en solución de fosfato 0.21 M (pH 8,2) a 1% (v/v). Se agregaron 2 mL de esta solución a 2 mL de tampón fosfato y 0.250 mL de muestra. Se incubó a 50 ° C durante 1 h, se adicionaron 2 mL de HCl 0,1 N para detener la reacción y su absorbancia fue leída a 340 nm. Los

resultados se compararon con una curva de calibración de glicina a diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 mg / mL) usando la siguiente ecuación (R = 0.9972):

$$y = 0.004x + 0.134$$

Los resultados se expresaron como mg de aminos libres por litro (mg/L NH :-).

Actividad antihipertensiva

El efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (i-ECA) se evaluó mediante espectrofotometría de acuerdo con Cushman y col., (1977). El compuesto utilizado como sustrato fue hipuril-histidil-leucina (Sigma Chemical, EE. UU.) el cual fue disuelto en borato de sodio 0.1 M, pH 8.3 adicionado con cloruro de sodio 0.3 M, para obtener una concentración final de 5 mM de sustrato. Se mezclaron 100 µL de esta mezcla con 40 µL de la muestra antes de agregar 10 µL de enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4 15.1, 5.1 U/mg; Sigma-Aldrich). La reacción tuvo lugar durante 1 hora y 15 minutos a 37 °C, la enzima se inactivó con 1 mL de HCl 0.1 M. El ácido hipúrico formado se extrajo con acetato de etilo y finalmente se volvió a diluir con agua destilada y se midió su absorbancia a 220 nm en un espectrómetro GENESYS.

La actividad inhibitoria de la ECA se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de actividad inhibitoria} = (\text{AbsC} - \text{AbsM}) / (\text{AbsC} - \text{AbsB}) \times 100$$

Dónde:

AbsC = Ácido hipúrico formado durante la acción de la ECA sin inhibidor

AbsB: Hippuril-histidil-leucina no reaccionada que se ha extraído con acetato de etilo

AbsM: ácido hipúrico formado después de la acción de la ECA en presencia de una sustancia inhibitoria.

Capacidad antitrombótica

Para evaluar la actividad antitrombótica, se utilizó la metodología de Zhang y col., (2008) con modificación en la concentración de cloruro de sodio propuesta por Pérez-Escalante y col., (2018). La absorbancia a 405 nm se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EE. UU.) Antes de agregar la enzima y después de 30 minutos de incubación a 37 °C. El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó con la siguiente ecuación

$$\% \text{ de inhibición} = [(C - CB) - (S - SB)] / (C - CB) * 100$$

Dónde:

CB (blanco de control): la absorbancia inicial del control negativo de inhibición

C (control): la absorbancia del control negativo a los 10 minutos de incubación con trombina

SB (muestra en blanco): La absorbancia inicial de la muestra.

S (muestra): la absorbancia de la muestra a los 10 minutos de incubación con trombina.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue evaluada por tres métodos diferentes.

ABTS

La capacidad antirradical se midió con el catión radical ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS ● +), que se produjo haciendo reaccionar 7 mmol/L de solución madre ABTS●+ con 2.45 mmol/L persulfato de potasio en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de ser utilizado. La solución ABTS●+ se diluyó con agua desionizada hasta una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 754 nm. Se añadió una alícuota de 20 μ L de muestra a 980 μ L de la solución ABTS●+ diluida, y se tomaron lecturas de absorbancia después de la incubación durante 7 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las mezclas se midió a 754 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EE. UU.). La capacidad antioxidante se expresó como mg de equivalentes de Trolox por litro (mg ET/100 g) (Kuskoski y col., 2005).

DPPH

La actividad antirradical se midió utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH●). Este se preparó en una solución etanólica (7.4 mg/100 ml). Se agregaron 100 μ L de la muestra a 500 μ L de solución de DPPH ●, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se agitó y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 520 nm en un lector de microplacas y se obtuvieron los mg equivalentes de Trolox por litro (mg ET/100 g) (Delgado-Andrade y col., 2005).

FRAP

La actividad antioxidante de FRAP se evaluó de acuerdo con la metodología de Benzie y Strain (1996) para la que se prepararon las soluciones como se describe a continuación: tampón de acetato de sodio de pH 3.6, 0.3 M, TPTZ, FeCl₃ 20 mM y FeSO₄ 5M. Para la preparación del FRAP, se mezclaron el tampón, TPTZ y FeCl₃ en una relación 10: 1: 1. La técnica consistió en agregar 30 μ L de muestra, 900 μ L de solución FRAP y 90 μ L de agua destilada, se agitó e incubó durante 10

minutos a 37 ° C, se leyó la absorbancia a 593 nm en un lector de microplacas. Los resultados se compararon con una curva de calibración de 0 a 1000 mM de FeSO₄. La actividad antioxidante se expresó como equivalentes micromoles de FeII por 100 g ($\mu\text{molFeII}/100\text{ g}$).

Aislamiento e identificación de péptidos bioactivos por RP-HPLC.

Preparación de la muestra

Se prepararon 10 mg/mL de proteína de amaranto hidrolizada y liofilizada con tampón fosfato de pH 7.8; la mezcla se agitó durante una hora a 37°C. La suspensión se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se separó para obtener la fracción soluble correspondiente.

RP-HPLC

Los péptidos se separaron por cromatografía de fase reversa (RP-HPLC). La separación se realizó en un sistema HPLC (Waters, EE. UU.) Equipado con un detector de matriz de fotodiodos (Spectra System Thermo Scientific, EE. UU.). Se utilizó una columna C8 (250 mm x 4,6 mm x 5 mm; Waters). Para eluir los péptidos se utilizó un gradiente lineal del 100% a 0 en 56 minutos utilizando disolvente A (agua con acetonitrilo [ACN] 98: 2) con ácido trifluoroacético [TFA] (650 μL por litro de disolvente) contra el disolvente B (agua con ACN 35:65; con 650 μL de TFA por litro de disolvente) en flujo de 1 mL/min. La separación se realizó a 40 ° C y se midió a 280 nm. Las fracciones se recolectaron manualmente cada minuto y la cantidad de proteína se evaluó mediante la técnica de Bradford (Kruger, 2009). El análisis de bioactividad se realizó solo en muestras liofilizadas que tuvieron proteína.

Espectrometría MALDI-TOF

Los picos recolectados con las bioactividades más altas se filtraron a través de un filtro Minisart RC4 (0.45 μm) y se analizaron mediante un espectrómetro de masas de ionización de desorción láser asistida por matriz (MALDI) equipado con una fuente de extracción retardada y un láser de nitrógeno pulsado de 355 nm. Se ejecutó un MALDI scoutMTPTM en el modo lineal. La muestra diluida 100 veces se mezcló con 1 volumen de soluciones de matriz (20 mg/ml de ácido sinapínico en acetonitrilo/agua, 50:50, v/v). Finalmente, se depositaron 0.5 μl de la mezcla sobre la placa diana MALDI. Todos los espectros fueron los resultados de promedios de señal de 200 disparos. El MALDI-TOF/TOF MS/MS se ejecutó en el modo de refractor positivo. La secuenciación de péptidos se realizó procesando los espectros MS/MS utilizando el software Auto eXecute versión 15.0.

Análisis estadístico

Todos los valores se obtuvieron por triplicado y se expresaron por desviación estándar de la media (DE). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando el sistema SPSS® para WINTM versión 15.0.

Resultados

Hidrólisis enzimática

Una vez que se agregaron las enzimas, los grupos amino libres se evaluaron cada 20 minutos para determinar el tiempo en que se alcanzaba su concentración más alta. Se obtuvieron 6170.53 ± 29.5 mg/L de NH: - después de 120 minutos de hidrólisis en H1. En contraste, H2 alcanzó la mayor concentración (5551.11 ± 33.83 mg / L NH :-) después de 90 minutos de actividad. Estos valores mostraron que la hidrólisis con alcalasa es más efectiva en la liberación de fracciones peptídicas. Después del análisis de H1 y H2, se realizó H3 y se obtuvo un contenido de 7468.89 ± 34.79 mg/L de NH: - al final de la hidrólisis de H3 y fue la cantidad más alta alcanzada en comparación con H1 y H2. Mientras que fueron necesarios 90 minutos para H2, solo 40 minutos después de la adición de flavourzyme (la misma enzima de H2), se tomaron para finalizar el proceso H3 (combinado con ambas enzimas).

Análisis de bioactividad de hidrolizados

La tabla 4.1 muestra la bioactividad determinada durante la hidrólisis de proteínas. La inhibición de la trombina alcanzó valores en torno al 80% en H2, mientras que se logró un 90% de la inhibición en H1, sin encontrar diferencias significativas entre H1 y H3. Cuando se evaluó la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, se observó que H3 obtuvo la inhibición más alta (58%), en comparación con H1 y H2 (49% y 39%, respectivamente). Finalmente, la actividad antioxidante se midió mediante tres métodos diferentes utilizando los antirradicales ABTS, DPPH y FRAP. La hidrólisis llevada a cabo en H3 obtuvo la mayor actividad antioxidante en contraste con el proceso H1 y H2, en dos de los tres métodos; aumentando de 76.66 a 388.94 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para DPPH; y de 63.37 a 592.54 $\mu\text{mol E FeII}/100\text{g}$ para FRAP. Mientras que la hidrólisis H1 obtuvo la mayor actividad antioxidante medida por el método ABTS en este estudio (425.86 ± 0.66 mg TE / 100 g). Además, se observó un mayor aumento después de la adición de flavourzyme mediante el ensayo FRAP en H3 (de 241.70 a 592.54 $\mu\text{mol de FeII}/100\text{g}$).

Tabla 4.1. Bioactividad de hidrolizados obtenidos por hidrólisis enzimática de proteína de amaranto

Hidrólisis	Inhibición de ECA (%)	Inhibición de trombina (%)	Actividad Antioxidante		
			DPPH ($\mu\text{mol Trolox E/100g}$)	ABTS (mg Trolox E/100g)	FRAP ($\mu\text{mol FeII E/100g}$)
Proteína	10.58±1.19 ^d	11.90±10.10 ^c	76.66±1.60 ^d	115.65±10.30 ^d	63.37±5.72 ^c
H1	49.49±1.47 ^b	92.85±3.36 ^a	340.17±10.95 ^b	425.86±0.66 ^a	241.70±9.38 ^b
H2	39.77±2.15 ^c	80.95±13.46 ^b	274.03±10.84 ^c	398.36±3.62 ^c	226.29±11.20 ^b
H3	58.53±2.58 ^a	92.85±3.36 ^a	388.94±2.73 ^a	404.90±1.52 ^b	592.54±29.29 ^a

Los valores se expresan como \pm promedio de desviación estándar (n=3); valores en la misma columna con diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Separación por RP-HPLC y bioactividad de fracciones.

De acuerdo con los resultados de bioactividad, H3 fue el método con los mayores resultados y fue el método seleccionado para llevar a cabo la separación e identificación de las secuencias de péptidos. Se obtuvieron 56 fracciones a través de la separación por RP-HPLC; de estas muestras, solo se detectaron 14 fracciones con proteína. Durante la separación, se observaron claramente los picos del minuto 1 al 27, sin embargo, el contenido de proteína se determinó en muestras tomadas después del minuto 27 (tabla 2). Para las 14 fracciones identificadas con proteína, se evaluó su bioactividad y se calculó su IC_{50} para la ECA y la trombina, y la SC_{50} para el ABTS. Los resultados se presentan en la tabla 4.2.

La IC_{50} antihipertensiva varió de 0.134 a 0.808 mg/mL (tabla 4.2), estos resultados fueron similares a los reportados en hidrolizados de proteínas de amaranto (Tiengo y col., 2009; Tovar-Pérez y col., 2009). Por otro lado, estos valores fueron más bajos que los de otras fuentes de proteínas vegetales (Rudolph y col., 2017), pero más altos que los reportados para la leche de búfalo (Abdel-Hamid y col., 2017). Los valores de SC_{50} antioxidante se ubicaron entre 0.992 y 6.931 mg/mL, estos resultados son ligeramente más altos que los obtenidos en los hidrolizados de amaranto por digestión *in vitro* (Orsini-Delgado y col., 2015). Esta diferencia puede explicarse por la liberación de diferentes secuencias de péptidos, que dependen no solo de la naturaleza de las proteínas, sino

también de las enzimas utilizadas en particular (Zhang y col., 2011; Zhang, 2016). En lo que concierne a la trombina los valores de IC₅₀ estuvieron entre 0.992 y 38.46 mg/L, que son valores similares en comparación con los reportados por el amaranto hidrolizado con alcalasa y pepsina (Sabbione y col., 2015). En este estudio se observó que después de la adición de flavourzyme, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de IC₅₀ para la inhibición de la trombina, y ambos estudios utilizaron como primera enzima alcalasa, lo que puede explicar las similitudes en sus datos.

Tabla 4.2. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina-I y Trombina (IC₅₀, mg/L) y actividad antioxidante (ABTS SC₅₀, mg/L) de fracciones de proteína de amaranto.

Fracción	ECA (IC₅₀)	Trombina (IC₅₀)	ABTS (SC₅₀)	Concentración péptido (mg/L)
2	0.332 ^{cd}	38.46 ⁱ	4.204 ^e	0.2125
3	0.442 ^e	4.36 ^h	NI	0.8375
9	NI	0.426 ^f	NI	0.9062
18	0.614 ^f	2.65 ^g	2.538 ^d	0.7125
19	0.173 ^b	0.183 ^b	NI	0.3750
22	0.158 ^{ab}	0.167 ^{ab}	1.375 ^b	0.4687
23	NI	0.349 ^e	2.809 ^d	0.5625
27	0.808 ^c	0.402 ^f	1.616 ^c	0.3125
28	0.346 ^d	0.135 ^a	1.728 ^c	0.0937
32	0.192 ^b	0.298 ^d	6.931 ^g	0.4687
34	0.317 ^{cd}	0.247 ^c	2.593 ^d	0.4937
39	NI	0.247 ^c	5.561 ^f	0.4375
40	0.298 ^c	0.26 ^{cd}	4.547 ^e	0.8375
45	0.134 ^a	0.155 ^a	0.992 ^a	0.8125

Los valores se expresan como promedios ± de desviación estándar (n=3); valores en la misma columna con distinta letra representa diferencias significativas (p < 0.05). NI= no identificado.

En base a estos resultados, se seleccionaron fracciones con la mayor multi-bioactividad para identificar las secuencias responsables de la bioactividad. Las fracciones 22 y 45 se sometieron a MALDI-TOF para conocer la composición de sus cadenas de aminoácidos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Péptidos identificados en las fracciones más activas de hidrolizados de proteína de amaranto.

PICO	Meas M/z	Calc MH+	Secuencia	Proteína
FRACCIÓN 22				
34	1375.643	1375.634	ITASANEPDENKS	Aglutinina
3	573.225	573.351	LVRW	Aglutinina
16	874.444	874.481	NIDMLRL	Granule bound starch synthase I
12	794.380	794.420	RPVFEF	Granule bound starch synthase I
5	686.341	686.408	DPKLTL	Granule bound starch synthase I
3	573.225	573.361	IKEAL	Granule bound starch synthase I
13	812.360	812.426	NVEVHKS	Cystatin
FRACCIÓN 45				
27	853.433	853.432	HVQLGHY	Aglutinina
14	707.350	707.321	SQIDTGS	Aglutinina
14	707.350	707.318	NWACTL	Aglutinina
4	547.192	547.299	VRWS	Aglutinina
29	861.384	861.429	CIHNIVY	Granule bound starch synthase I
26	845.409	845.425	EGTESIPL	Granule bound starch synthase I
24	841.424	841.384	PRYDQY	Granule bound starch synthase I
19	823.428	823.369	MSNIDML	Granule bound starch synthase I
13	686.380	686.408	DPKLTL	Granule bound starch synthase I
6	619.280	619.356	IPSRF	Granule bound starch synthase I
3	531.192	531.304	ARVW	Granule bound starch synthase I
2	505.190	505.244	CQAAL	Granule bound starch synthase I
1	503.173	503.271	EELL	Granule bound starch synthase I
1	503.173	503.282	LGVAGS	Granule bound starch synthase I

Discusión

Los resultados de la hidrólisis enzimática son similares a los reportados por Zhuang y col., (2013) y Ma y col., (2014), donde observaron que la actividad enzimática de alcalasa y flavourzyme en trigo y soya, disminuía después de 90-120 minutos de actividad. El tiempo de actividad enzimática dependerá de la naturaleza de la matriz proteica, así como de la cantidad de enzima y sustrato en el medio. Además, en otros estudios realizados en otras matrices proteicas como la proteína de Tilipa, se ha reportado un mayor grado de hidrólisis con el uso de alcalasa (Foh y col., 2010). Los resultados de H3 pueden compararse con los reportados por Cumby y col., (2008) en proteína de canola, donde encontraron que el grado de hidrólisis aumentó poco en hidrólisis en secuencia comparado con la hidrólisis con solo alcalasa, debido a que la hidrólisis con alcalasa no permite la liberación de sustratos específicos para flavourzyme. Pero el grado de hidrólisis depende de la naturaleza de la proteína y de la especificidad de las enzimas utilizadas (Zhang y col., 2010; Zhang y col., 2016).

Las enzimas alcalase y flavourzyme se han utilizado en procesos continuos y separados en diferentes proteínas alimenticias en busca de péptidos inhibidores de la agregación de plaquetas (Cian y col., 2018; Kasiwut y col., 2018). Pero la adición de una segunda enzima (diferente de la flavourzyme) después de alcalase en la proteína amaranto, ha representado un aumento en la inhibición de la trombina, lo que demuestra que un mayor grado de hidrólisis es importante para lograr un aumento en la actividad antitrombótica. Sabbione y col., 2015; Sabbione y col., 2016). Además, Sabbione y col., (2015) observaron que el grado de hidrólisis de las proteínas de amaranto era un factor importante para aumentar el porcentaje de inhibición de la trombina, especialmente al hidrolizar la albúmina y globulina de las proteínas de amaranto, encontrando porcentajes de inhibición de alrededor del 81%, valor cercano al del presente estudio (80% y 90% a H2 y, H1 y H3 respectivamente).

El aumento en la actividad de inhibición de la trombina puede deberse, a que la proteína de amaranto tiene secuencias peptídicas capaces de inhibir el fibrinógeno, que se liberan por la acción de enzimas proteolíticas. También se ha observado que no solo el tamaño del péptido es importante para la inhibición de la trombina, sino también las secuencias peptídicas, que pueden ser homólogas en posición a la secuencia de la cadena de γ -fibrinógeno humano (Cheng y col., 2019). Por lo tanto, la actividad antitrombótica está influenciada por la competencia de los receptores plaquetarios entre la casoplatelina y la cadena γ defibrinógeno humano (Laudano y

Doolittle 1978; Fiat y col., 1989). Se ha informado que alcalasa es una enzima capaz de liberar péptidos antitrombóticos de proteínas como el maní (Zhang, 2016), pero existe poca información sobre la adición de flavourzyme y su actividad hidrolítica sobre los péptidos con capacidad antitrombótica liberados en amaranto.

Los resultados de la actividad antihipertensiva son similares a los reportados por Ambigaipalan y col., (2015). Observaron que la combinación de dos o más enzimas, permite el aumento de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en la proteína de la semilla del dátil con experimentos enzimáticos en secuencia. Muchos autores han informado que la variación en la actividad antihipertensiva de los péptidos liberados se puede atribuir a las diferencias en la composición y la hidrofobicidad de la estructura primaria de la proteína (Jung y col., 2006; Wijesekara y Kim 2010). En este sentido, los residuos hidrófobos de los aminoácidos (leucina, valina, alanina, triptófano, tirosina, prolina y fenilalanina) se unen en los sitios catalíticos de ECA que actúan como inhibidores competitivos (Hanafi y col., 2018). Las proteínas de la leche se han reportado como una buena fuente de péptidos bioactivos, especialmente aquellos con actividad antihipertensiva alcanzando valores de inhibición de ECA mayores del 80% (González-González y col., 2011; Ayyash y col., 2018). En estudios con péptidos liberado de proteínas vegetales como el amaranto, particularmente a partir de la globulina 11S, se han reportado valores de IC_{50} de 6.32 mM y 175 μ M (Tovar-Pérez y col., 2009; Vecchi y Añón 2009). Una característica importante de los péptidos antihipertensivos es su bajo peso molecular (Miralles y col., 2018), en este estudio se encontraron péptidos con esta característica cuando se realizó una electroforesis SDS-PAGE-tricina (datos no mostrados)

Además de la actividad antihipertensiva, el tamaño de la secuencia peptídica (cadenas peptídicas de menos de 20 aminoácidos) se ha relacionado también con la capacidad antioxidante, lo que demuestra que los péptidos más pequeños tienen una mayor actividad (Zou y col., 2016). Esto explica por qué se obtuvo una mayor actividad antioxidante en H3, cuya concentración de grupos amino fue mayor. Inclusive, durante las tres hidrólisis, se liberaron péptidos con diferentes mecanismos de acción, ya sean péptidos capaces de quelar agentes reactivos o donar electrones o hidrógeno, con diferentes comportamientos en las técnicas evaluadas (Virtanen y col., 2007). En varios estudios, donde la hidrólisis de proteínas con diferentes enzimas se ha llevado a cabo en procesos secuenciales, los autores han observado que la actividad antioxidante es la misma o podría incrementarse con la adición de la segunda enzima (Je y col., 2009; Chirinos y col., 2018). La

adición de una segunda enzima permite la liberación de nuevos péptidos bioactivos y la secuencia liberada modifica la capacidad antioxidante (Choi y col., 2019).

Los resultados de la separación por RP-HPLC son similares a los reportados por Moronta y col., (2016), quienes hidrolizaron proteínas de amaranto con alcalasa, y encontraron que los péptidos más polares eran aquellos con mayor actividad antiinflamatoria. Aunque una fracción encontrada en la región no polar del análisis cromatográfico (45 minutos) obtuvo valores más altos en la actividad antihipertensiva, antitrombótica y antioxidante que los medidos en otras fracciones polares. En algunos estudios, se ha demostrado que los péptidos que contienen aminoácidos hidrófobos pueden mejorar las actividades antihipertensivas y antioxidantes (Ijaritomi y col., 2018).

En la tabla 3 se puede observar que la secuencia más larga identificada (ITASANEPDENKS) pertenecía a la fracción 22, cuyo peso molecular es aproximadamente 1.44 kDa, el más alto encontrado en ambas fracciones. En el caso del péptido NIDMLRL, la última parte de su secuencia (-LRL) se ha identificado, por sí sola, *in silico* como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina en amaranto. Esta aseveración puede explicarse por la presencia de leucina como aminoácido hidrofóbico que interactúa con el sitio activo de la ECA (Montoya-Rodríguez y col., 2015).

En la misma fracción 22, se encontró la secuencia LVRW, en la cual la cadena de aminoácidos LVR se ha descrito como un péptido con actividad antihipertensiva en la savia de higo y que cuenta con una IC_{50} inferior a 20 μM (Balgir y Sharma, 2017), al mismo tiempo que W puede ser un aminoácido de enlace en el sitio activo de la ECA. Por otro lado, la fracción 45 se identificó como la fracción con menor IC_{50} para la inhibición de la ECA. En esta fracción (fracción 45), VRWS tiene como parte de su estructura el dipéptido VR, que se ha descrito como un péptido antihipertensivo por sí mismo con un IC_{50} de 52.80 μM (Gómez-Ruiz y col., 2007), que unido a otros aminoácidos como Y o SP, ha mantenido su bioactividad (Wang y col., 2011; De Gobba y col., 2014). Además, la presencia de Tyr en C-terminal debería promover la unión a ECA y por lo tanto, su inhibición (Wu y col., 2006), siendo un ejemplo el tripéptido IVY (Ueno et al., 2005), que está presente en la secuencia CIHNIVY de esta fracción. Cabe señalar que varios péptidos de la fracción 45 tienen este aminoácido.

En trabajos anteriores sobre péptidos antioxidantes, estos se han caracterizado por estar formados por 5–16 residuos de aminoácidos (Umayaparvathi y col., 2014). Los resultados del

presente estudio apoyan la afirmación anterior al encontrar posibles péptidos antioxidantes con un peso molecular en el rango de 500 a 1400 Da con 4 a 13 residuos de aminoácidos (Tabla 3).

Uno de los péptidos identificados en la fracción 22 fue LVRW, este péptido podría ser el responsable de la actividad antioxidante. Haung y col., (2010) identificaron que el RW terminal en los péptidos puede dar una actividad antirradical alta debido a que el aminoácido W del terminal-C del péptido y el enlace peptídico entre R y W. Un efecto similar ocurre con el péptido ARVW, debido a la presencia de Trp cuya actividad antioxidante se debe principalmente a su grupo indol (Nimalaratne y col., 2011).

En la fracción 45, se identificó la secuencia DPKLTL, que puede tener capacidad antioxidante, debido a que DPK se ha descrito previamente como un péptido antioxidante, debido a la presencia de ácido aspártico, que tiene la capacidad de donar electrones e hidrógeno, pero también cuenta con la presencia de aminoácidos hidrófobos (Pro y Leu), que pueden mejorar la capacidad de eliminación de radicales de los péptidos (Lui y col., 2018). Además, este péptido puede presentar actividad antitrombótica debido a la presencia del residuo DPK, que es capaz de inhibir la trombina en su sitio activo (Sabbione y col., 2016).

De acuerdo con Wang y col., (2017), los péptidos con bioactividad antitrombótica generalmente contienen de 3 a 20 residuos de aminoácidos. La tabla 3 muestra una cadena de 13 aminoácidos como el péptido más largo identificado, en la fracción 22. Además, se reportó que las fracciones peptídicas con Val y Tyr pueden tener actividad antitrombótica (Cian y col., 2018), se encontró la mayor concentración de estos residuos en la fracción 45. La presencia de prolina-Arginina en el extremo N tiene la capacidad de inactivar la trombina en su sitio activo (Cheng y col., 2019). Este enlace está presente en la estructura PRYDQY, aunque se necesitan estudios más exhaustivos en el estudio de los péptidos antitrombóticos, ya que la trombina tiene tres dominios estructurales principales: un sitio catalítico y dos exositos (I y II), con diferentes características cada uno, y la enzima podría inhibirse si se bloquea algún sitio, con un nivel de inhibición de la trombina diferente (Cheng y col., 2019; Pérez-Escalante y col., 2018).

CONCLUSIONES

El hidrolizado de proteína de amaranto obtenido con alcalasa y flavourzyme en secuencia puede ser una fuente de péptidos bioactivos, al liberar secuencias diferentes a las de la digestión *in vitro* con pepsina y pancreatina, que es el método más común para la liberación de péptidos bioactivos de la proteína de amaranto. A partir de las secuencias encontradas en este estudio, se realizó una

comparación bibliográfica con los peptidos derivados de otras fuentes protéicas, y se encontraron similitudes en las estructuras peptídicas. A pesar de que no se identificaron todas las secuencias en estudios previos, se identificaron nuevas cadenas de aminoácidos con posibles funcionalidades múltiples, pero se necesitan más estudios para aseverar esto. Este estudio muestra que el amaranto hidrolizado con alcalasa y flavourzyme podría usarse en la industria nutracéutica como un ingrediente de valor agregado, con bioactividades multifuncionales.

REFERENCIAS

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., y Hamad. E. (2017) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal* 66: 91-98.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A.S., y Shahidi, F. (2015) Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysate prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods* 18: 1125-1137.
- Ayyash, M., Al-Dhaheeri, A.S., Mahadin, S.A., Kizhakkayil, J., y Abushelaibi, A. (2018) In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Dairy Science* 101: 1-12.
- Balbir, P.P., y Sharma, M. (2017) Biopharmaceutical potential of ACE-Inhibitory peptides. *Journal of Proteomics and Bioinformatics* 10: 171-177.
- Baltia, R., Bougatef, A., Silaa, A., Guillochon, D., Dhulster, P., y Nedjar-Arroume, N. (2015) Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 170: 519-525.
- Benzie, I., y Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power". The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Cheng, S., Tu, M., Liu, H., Zhao, G., y Du, M. (2019) Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification and interactions with thrombin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2019.
- Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar-Galvez, A., Carpentier, S., Pedreschi, R., y Campos D. (2018) Obtaining of peptides with *in vitro* antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science* 83: 139-146.
- Choi, Y., Lim, T., He, Y., y Hwang, T. (2019) Chemical characteristics and antioxidant properties of wheat gluten hydrolysates produced by single and sequential enzymatic hydrolyses using commercial proteases and their application in beverage systems. *Journal of Food Measurement and Characterization* 13: 745-754.
- Cian, R.E., Garzón, A.G., Martínez-Augustin, O., Botto, C.C., y Drago, S.R. (2018) Antithrombotic activity of Brewer's spent grain peptides and their effects on blood coagulation pathways. *Plant Foods for Human Nutrition* 73: 241-246.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., y Shahidi, F. (2008) Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry* 109: 144-148.
- Cushman, D.W., Cheung, H.B., Sabo, E.F., y Ondetti, M.A. (1977) Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme. Carboxylalkanoil and mercaptoalkanoil aminoacids. *Biochemistry* 16: 5484-5491.
- De Gobba, C., Tompa, G., y Otte, J. (2014) Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry* 15: 205-215.
- Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A., y Morales, F.J. (2005) Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 7832-7836.
- Fiat, A.M., Levy-Toledano, S., Caen, J.P., y Jolles, P. (1989) Biologically active peptides of casein and lactoferrin implicated in platelet function. *Journal of Dairy Research* 56: 351-355.
- Foh, M.B., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T., y Xia, W. (2010) Functionality and antioxidant properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Science* 11: 1851-1869.
- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., y Recio, I. (2007) Identification of a novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis* 28: 4202-4211.
- González-González, C.R., Tuohy, K.M., y Jauregi, P. (2011) Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 21: 615-622.
- Hanafi, M.A., Hashim, S.N., Yea, C.S., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul-Hamid, A., y Saari, N. (2018) High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean

- (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International* 106: 589-597.
- Haug, W.Y., Majumder, K., y Wu, J. (2010) Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry* 123: 635-641.
- Ijaritomi, O.S., Malomo, S.A., Alashi, A.M., Nwachukwu, I.D., Fagbemi, T.N., Osundahunsi, O.F., y Aluko, R.E. (2018) Antioxidant and antihypertensive activities of wonderful cola (*Buchholzia coriacea*) seed protein and enzymatic protein hydrolysates. *Journal of Food Bioactives* 3: 133-143
- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., y Ahn, C.B. (2009) Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produces from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International* 42: 1266-1272.
- Jew, S., AbuMweis, S.S., y Jones, P.J.H. (2009) Evolution of the human diet: Linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *Journal of Medicinal Food* 12: 925-934.
- Jung, W.K., Mendis, E., Je, J., Park, P.J., Son, B., Kim, H.C., Choi, Y.K., y Kim, S.K. (2006) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 94: 26-32.
- Kasiwut, J., Sirinupong, N., y Wirote, Y. (2018) The anticoagulant and angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory peptides from tuna cooking juice produced by alcalase. *Current Nutrition and Food Science* 14: 225-234.
- Kruger, N.J. (2009) The Bradford Method For Protein Quantitation. En: Walker, J.M. (eds) The protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Human Press, Totowa, NJ.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., y Fett, R. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de fruto. *Ciência y Tecnología Alimentaria* 25: 726-732.
- Laudano, A.P., y Doolittle, R.F. (1978) Synthetic peptides derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 75: 3085-3089.
- Liu, C., Ren, D., Li, J., Fang, L., Wang, J., Liu, J., y Min, W. (2018) Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fish) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 42: 203-215
- Ma, Y., Wang, L., Sun, X., Zhang, J., Wang, J., y Li, Y. (2014) Study on Hydrolysis Conditions of Flavourzyme in Soybean Polypeptide Alcalase Hydrolysate and Soybean Polypeptide Refining Process. *Advance Journal of Food Science and Technology* 6: 1027-1032.
- Martínez, N.E., y Añón, C.M. (1996) Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 2523-2530.
- Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suarez, J.C., y Yada R.Y. (2018) Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58: 2147-2163.
- Mendonça, S., Saldiva, P.H., Cruz, R.J., y Areas, A.G. (2009) Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry* 116: 738-742.
- Miralles, B., Amigo, L., y Recio, I. (2018) Critical Review and Perspective on Food-Derived Antihypertensive Peptides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 66: 9384-9390.
- Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Fávela, M.A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., y González de Mejía, E. (2015) Identification of Bioactive Peptides Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seeds Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 139-159.
- Moronta, J., Smaldini, P.L., Docena, G.H., y Añón, M.C. (2016) Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods* 21: 463-473.
- Najafian, L., y Babji, A.S. (2014) Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods* 9: 280-289.
- Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Scheiber, A., y Wu, J. (2011) Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. *Food Chemistry* 129: 151-161.

- Orsini-Delgado, A., Galleano, M., Añón, M.C., y Tironi, V.A. (2015) Amaranth peptides from simulated gastrointestinal digestion: Antioxidant Activity against Reactive species. *Plants Foods for Human Nutrition* 70: 27-34.
- Orsini-Delgado, M.C., Torini, V.A., y Añón, M.C. (2011) Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology* 44: 1752-1760.
- Pérez-Escalante, E., González-Olivares, L.G., Cruz-Guerrero, A.E., Galán-Vidal, C.A., Páez-Hernández, M.E., y Álvarez-Romero, G.A. (2018) Size exclusion chromatography (SEC-HPLC) as an alternative to study thrombin inhibition. *Journal of Chromatography B* 1074: 34-38.
- Raikos V, Dassios T. 2014. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Sci Technol* 94: 91–101.
- Rudolph, S., Lunow, D., Kaiser, S., y Henle, T. (2017) Identification and quantification of ACE-inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins. *Food Chemistry* 224: 19-25.
- Sabbione, A.C., Nardo, E.A., Añón, M.C., y Scilingo, A. (2016) Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* 20: 204-214.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A., y Añón M.A. (2015) Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Food Science and Technology* 60: 171-177.
- Sashidhar, R.B., Capoor, A.K., y Ramana, D. (1995) Quantification of amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods* 167: 121-127.
- Tiengo, A., Faria, M., y Neitto, E.M. (2009) Characterization and ACE-Inhibitory activity of Amaranth proteins. *Journal Food Science* 74: H121-H126.
- Tironi, V.A., y Añón, M.C. (2010) Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International* 43: 315–322.
- Tovar-Pérez, E.G., Guerrero-Legarreta, B.C., Ferrés-González, A., y Soriano-Santos, J. (2009) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry* 116: 437–444.
- Tovar, L.R. (2018) *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*, CRC Press, Boca Raton, 2018.
- Udenigwe, C.C., y Aluko, R.E. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77: 11–24.
- Ueno, T., Tanaka, M., Matsui, T., y Matsumoto, K. (2005) Determination of antihypertensive small peptides, Val-Tyr and Ile-Val-Tyr, by fluorometric high-performance liquid chromatography combined with a double heart-cut column-switching technique. *Analytical Science* 21: 997-1000.
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., y Balasubramanian, T. (2014) Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutritional* 4: 343–353.
- Vecchi, B., y Añón, M.C. (2009) ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry* 70: 864-870.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., y Korhonen, H. (2007) Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 102: 106–115.
- Wang, X., Wu, S., Xu, D., Xie, D., y Guo, H. (2011) Inhibitor and substrate binding by angiotensin-converting enzyme: Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Studies. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51: 1074-1082.
- Wang, X.Q., Yu, H.H., Xing, R., y Li, P.C. (2017) Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International* 2017: 1-16.
- Wattanasirithama, L., Theerakulkaita, C., Wickramasekara, S., Maierb, C.S., y Stevensc, J.F. (2016) Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry* 192: 156-162.
- Wijesekara, I., y Kim, S.K. (2010) Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs* 8: 1080–1093.

Wu, J., Aluko, R.E., y Nakai, S. (2006) Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of di and tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 732-738.

Zhang, B.S. (2016) In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food Chemistry* 202: 1-8.

Zhang, B.S., Zhang, W., y Xu, S.Y. (2008) Antioxidant and antithrombotic activity of raoseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 521-527.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, G., Wang, X., y Yao, H. (2010) Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysates by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry* 119: 226-234.

Zhuang, H., Tang, N., y Yuan, Y. (2013) Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods* 5: 1810-1821.

Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., y Xia, W.Q. (2016) The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 12: 1-14.