



**Secretaría de Educación Pública**



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
**Instituto Tecnológico de Veracruz**

**Identificación de péptidos bioactivos en fracciones proteicas de  
*Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas por bacterias  
lácticas**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Alimentos

Presenta:

M.C. Fabiola Sánchez López

Director de Tesis:

Dr. Víctor Robles Olvera

Coasesores:

Dra. Madeleine Hidalgo Morales

Dr. Gerardo Valerio Alfaro

H. Veracruz Ver.

Mayo, 2021



H. Veracruz, Veracruz, **25/febrero/2021**  
OFICIO: ITV/DEPI/No.051/2021  
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. FABIOLA SANCHEZ LOPEZ**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos titulada:

**“Identificación de péptidos bioactivos en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas por bacterias lácticas”**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*  
*Antorcha y Luz de Fuego Permanente*

  
**OLAYA PIRENE CASTELLANOS ONORIO**  
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST

**EL. H. JURADO**

  
**DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES**  
PRESIDENTE

  
**DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ**  
SECRETARIO

  
**DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO**  
VOCAL 1

  
**DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ**  
VOCAL 2

  
**DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA**  
VOCAL 3

  
**DRA. PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARCÍA**  
SUPLENTE 1

  
**DR. GERARDO VALERIO ALFARO**  
SUPLENTE 2

c. p. Expediente del Estudiante Archivo OPCO\*





El presente trabajo de tesis titulado "Identificación de péptidos bioactivos en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizada por bacterias lácticas" presentado por el (la) C. FABIOLA SÁNCHEZ LÓPEZ, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTOR

DR. VICTOR JOSÉ NOBLES OLVERA

CODIRECTOR

DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES

CODIRECTOR

DR. GERARDO VALERIO ALFARO

REVISORA

DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ

REVISOR

DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO

REVISORA

DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ

REVISORA

DRA. PATRICIA GUILTERMINA MENDOZA GARCÍA



## DEDICATORIA

**A mis papás, Laura y Fabián:** Pilares fundamentales en mi vida, gracias por su amor, cariño, y apoyo en todo momento, por siempre motivarme y creer en mis sueños. Les dedico mi esfuerzo. Mi éxito también es el suyo. Gracias a Dios, que nos permite celebrar este momento. Los adoro.

**A mi hermano Orlando:** Gracias por demostrarme que la vida hay que disfrutarla. Sigamos encontrando playas bonitas que visitar.

**A Masiel:** Mi Meredith Grey de mi Cristina Yang. No hay más. Te quiero, hermana.

**A Edith:** Por ser fuente de inspiración, por creer en mí, por cada palabra bonita para animarme a seguir luchando por lo que quiero. Gracias por compartir y celebrar de los buenos y no tan buenos momentos de nuestra vida. Sigamos sumando. Te quiero, bombona.

**A Diana y Karyna:** Por esas risas escandalosas que te hacen doler el estómago, por sus palabras de aliento a pesar de ser la Chandler Bing del grupo. Gracias por su buena vibra siempre y celebrar momentos importantes con cosas ricas de comer. Las quiero, locas. Y a Angelito también.

**A Gabriela:** Mi estancia en Canadá no hubiera sido lo mismo sin ti, reyna querida. Porque después de esa simpática coincidencia en el mismo laboratorio, nuestra amistad ha sido testigo de momentos importantes en nuestras vidas. A la distancia yo te llevo un poco de México. Gracias por tu apoyo.

**A Carmen:** Gracias por haber hecho divertido mi paso en Enzimología, por tu apoyo y amistad. Te quiero, esposa.

**A Manuel:** Tú quieres una cuartilla especial para ti, pero unos cuantos renglones no son suficientes para agradecer todo lo vivido desde que decidiste no odiarme más. Gracias por ser el mejor equipo, compañero, amigo, roomie, hermano de otra madre que la vida me pudo dar. Este final lo comparto contigo, porque en cada etapa de este trabajo fuiste pieza importante para que saliera adelante. Gracias por hacerlo todo más liviano y divertido también. Te adoro, Pity. Vamos por más. ¿Qué no?

## **RECONOCIMIENTOS**

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este proyecto.

### **A la Universidad de Carleton**

Por la vinculación establecida con el Tecnológico Nacional de México para el seguimiento de este proyecto y su buen termino.

### **A mi directora de tesis**

Agradezco a la Dra. Madeleine Hidalgo Morales por la confianza depositada en mí y darme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Enzimología, gracias por el arduo trabajo y su guía en este proyecto.

### **A mis Coasesores**

Agradezco especialmente al Dr. Víctor José Robles Olvera por el apoyo y aceptar la co-dirección de este proyecto de investigación. Gracias por sus consejos y ser guía en todo momento. Al Dr. Gerardo Valerio Alfaro por sus consejos para la mejora de este proyecto.

### **A mi comité revisor**

Por su cooperación y sus valiosos consejos.

### **Al Dr. Apollinaire Tsopmo**

Por darme la oportunidad de trabajar con él, por su ayuda, paciencia, orientación, conocimiento y apoyo académico.

## RESUMEN

Sánchez López, Fabiola. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Febrero, 2021. Identificación de péptidos bioactivos en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas por bacterias ácido lácticas. Director de tesis: Dr. Víctor J. Robles Olvera. Coasesores: Dra. Madeleine Hidalgo Morales y Dr. Gerardo Valerio Alfaro.

El *Amaranthus hypochondriacus* spp. es un cereal comúnmente cultivado en América Latina y es conocido por su alto contenido en proteínas. Las albúminas, glutelinas y globulinas son las principales proteínas de reserva en las semillas de amaranto. Se ha demostrado que estas proteínas de reserva exhiben diversas actividades biológicas como antihipertensiva, antioxidante y antitrombótica, y se liberan principalmente por digestión *in vitro*. Hasta ahora solo existe un reporte que comprobó la liberación de péptidos con actividad biológica de la proteína total de *Amaranthus hypochondriacus* por acción de la actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de bacterias lácticas para liberar péptidos bioactivos a partir de fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus*. Se utilizó harina de semilla de amaranto desengrasada para extraer proteínas de reserva de acuerdo con su solubilidad (albúminas, globulinas, 7S-G, 11S-G y glutelinas). A cada fracción se le determinó la concentración de proteína y se caracterizó mediante electroforesis SDS-PAGE y LC-MS/MS. Las fracciones de proteína se hidrolizaron con células de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* cosechadas en fase exponencial (4 y 8 h) y estacionaria (14 y 24 h). Se evaluó la actividad antioxidante, la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la quelación de Zinc en muestras hidrolizadas y ultrafiltradas con membranas de corte de peso molecular de 10, 3, 1 kDa. Los hidrolizados que mostraron bioactividad fueron analizados por nLC/MS-MS. Como resultados, se observó que los pesos moleculares de las proteínas (SDS-PAGE) presentes en las fracciones fueron de 97 a 14 kDa y las proteínas identificadas por LC/MS-MS incluyeron aglutinina, inhibidor de tripsina, cistatina y globulina 11S. El contenido de grupos amino libres en los hidrolizados producidos con *L. helveticus* fue del 5.15% frente al 4.79% de los obtenidos con *L. plantarum*. La mayor captación de radicales ROO• se observó en las fracciones de albúminas ( $1037 \pm 80 \mu\text{M TE/g}$  de proteína) y glutelinas ( $2264 \pm 64 \mu\text{M TE/g}$  de proteína) hidrolizadas con *L. helveticus* y *L. plantarum*, respectivamente. La mayor captación de radicales •OH se observó en los hidrolizados de 11S-G con los dos lactobacilos en fase estacionaria. La inhibición más alta de ACE (45%) se observó en las glutelinas y 11S-G hidrolizadas durante 8 h con *L. plantarum*. La fracción ultrafiltrada con corte de <3-1 kDa de 11S-G mostró 60% de inhibición de ACE y mayor captación de •OH ( $48.10 \pm 2.2 \%$ ). El análisis de los resultados de la espectrometría de masas permitió la identificación de péptidos con secuencias de aminoácidos reportadas previamente con actividad antihipertensiva, principalmente. Los resultados mostraron que la hidrólisis de las fracciones de proteínas de reserva de *Amaranthus hypochondriacus* con *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* liberó péptidos con actividad biológica y que la etapa de crecimiento de los *Lactobacillus* tiene influencia sobre cantidad de péptidos liberados.

## ABSTRACT

Sánchez López, Fabiola. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. February, 2021. Identification of bioactive peptides in protein fractions of *Amaranthus hypochondriacus* hydrolyzed by lactic acid bacteria. Thesis advisor: Dr. Víctor J. Robles Olvera. Coauthors: Dra. Madeleine Hidalgo Morales, Dr. Gerardo Valerio Alfaro.

*Amaranthus hypochondriacus* spp. is a commonly grown cereal in Latin America and is known for its high protein content. Albumins, glutelins, and globulins are the principal seed storage proteins in amaranth seeds. These storage seed proteins had exhibited different biological activities, such as antihypertensive, antioxidant, antithrombotic; and been released mainly by *in vitro* digestion. Until now, there is only one report that confirmed the release of peptides with biological activity from the total protein of *Amaranthus hypochondriacus* by the action of the proteolytic activity of lactic acid bacteria. The objective of this work was to evaluate the capacity of lactic acid bacteria to release bioactive peptides from protein seed fractions of *Amaranthus hypochondriacus*. Defatted amaranth seed flour was used to extract storage proteins according to their solubility (albumins, globulins, 7S-G, 11S-G, and glutelins). The protein concentration of each fraction was determined and characterized by SDS-PAGE electrophoresis and LC-MS/MS. Protein fractions were hydrolyzed with Lb. cells. *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* harvested in exponential (4 and 8 h) and stationary (14 and 24 h) phase. Antioxidant activity, inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE), chelation of Zinc in hydrolyzed and ultrafiltered samples with cut-off membranes with a molecular weight of 10, 3, 1 kDa were evaluated. The hydrolysates that shown bioactivity were analyzed by nLC-MS/MS. As results, it was observed that, the molecular weights of the proteins (SDS-PAGE) present in the fractions ranged from 97 to 14 kDa and the proteins identified by LC-MS/MS included agglutinin, trypsin inhibitor, cystatin, and 11S globulin. Free amino group content in the hydrolysates produced with *L. helveticus* was up to 5.15% compared to 4.79% of those obtained with *L. plantarum*. The highest uptake of ROO• radicals was observed in the fractions of albumins ( $1037 \pm 80 \mu\text{M TE/g}$  of protein) and glutelins ( $2264 \pm 64 \mu\text{M TE/g}$  of protein) hydrolyzed with *L. helveticus* and *L. plantarum*, respectively. The highest uptake of •OH radicals was observed in the 11S-G hydrolysates with both lactobacilli in stationary phase. The highest inhibition of ACE (45%) was observed in glutelins and 11S-G hydrolyzed for 8 h with *L. plantarum*. The ultrafiltered fraction with <3-1 kDa cutoff of 11S-G showed 60% inhibition of ACE and greater uptake of •OH ( $48.10 \pm 2.2\%$ ). The analysis of the mass spectrometry results allowed the identification of peptides with amino acid sequences previously reported with antihypertensive activity, mainly. The results showed that the hydrolysis of the storage protein fractions of *Amaranthus hypochondriacus* with *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* released peptides with biological activity and that the growth stage of *Lactobacillus* had an influence on the number of peptides released.

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Historia del cultivo de Amaranto.....	3
2.1.1	Características del cultivo.....	3
2.2	Semilla del Amaranto.....	6
2.2.1	Proteínas de reserva.....	8
2.3	Péptidos Bioactivos.....	12
2.3.1	Clasificación de péptidos bioactivos.....	13
2.3.2	Actividades biológicas identificadas en péptidos.....	14
2.3.2.1	Péptidos antimicrobianos.....	15
2.3.2.2	Péptidos inmunomoduladores.....	16
2.3.2.3	Péptidos antihipertensivos.....	17
2.3.2.4	Péptidos antioxidantes.....	18
2.3.2.5	Péptidos anticancerígenos.....	19
2.3.3	Obtención de péptidos bioactivos.....	20
2.3.4	Péptidos bioactivos en el amaranto.....	22
2.4	Bacterias lácticas.....	25
2.4.1	Sistema proteolítico de las bacterias lácticas.....	27
2.4.1.1	Sistema proteolítico de <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	29
2.4.1.2	Sistema proteolítico de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	31
3	JUSTIFICACIÓN.....	34
4	OBJETIVOS.....	35
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1	Esquema general de trabajo.....	36
5.2	Material biológico.....	37

5.3	Obtención de harina de semillas de amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> ).....	37
5.4	Extracción de fracciones de proteína de reserva .....	37
5.5	Determinación de la concentración de proteína en las fracciones .....	38
5.6	Caracterización de las fracciones proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). .....	39
5.7	Análisis de las fracciones de proteínas de reserva por espectrometría de masas	39
5.8	Hidrólisis de las fracciones por actividad proteolítica de las bacterias .....	40
5.8.1	Determinación de proteólisis.....	41
5.9	Determinación de las actividades biológicas .....	42
5.9.1	Determinación de la actividad antihipertensiva.....	42
5.9.2	Determinación de la actividad antioxidante.....	43
5.9.2.1	Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC).....	44
5.9.2.2	Capacidad de captación de radicales hidroxilo ( $\bullet$ OH).....	44
5.9.3	Capacidad de quelación de Zinc.....	45
5.10	Ultrafiltración por membranas .....	45
5.11	Identificación de secuencias de aminoácidos en los péptidos obtenidos por hidrólisis con BAL.....	46
5.11.1	Análisis por espectrometría de masas .....	46
5.11.2	Identificación de péptidos.....	47
5.12	Análisis estadístico .....	47
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
6.1	Caracterización de las fracciones proteicas de reserva de <i>A. hypochondriacus</i> .....	48
6.2	Estandarización de las condiciones de hidrólisis para evaluar la liberación de péptidos a partir de fracciones proteicas de <i>A. hypochondriacus</i> por <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	54
6.2.1	Caracterización de crecimiento celular de <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	54
6.2.2	Hidrólisis de las fracciones por actividad proteolítica de las bacterias....	56

6.2.3	Evaluación de la actividad biológica .....	68
6.2.3.1	Actividad Antioxidante en hidrolizados de fracciones proteicas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	68
6.2.3.2	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) .....	68
6.2.3.3	Captación de radicales hidroxilo (HO•).....	73
6.2.4	Capacidad de quelación de Zinc de las fracciones de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	78
6.2.5	Actividad antihipertensiva de las fracciones de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	81
6.3	Péptidos identificados por nLC-MS/MS en muestras de proteínas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> hidrolizadas por <i>L. plantarum</i> .....	86
7	CONCLUSIONES .....	93
8	BIBLIOGRAFÍA.....	94

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Rendimiento del cultivo de amaranto, algunos cereales y leguminosas.....	5
Tabla 2.2 Análisis proximal del grano de amaranto ( <i>A. hypochondriacus</i> ) y otros cereales. ....	6
Tabla 2.3 Comparación de aminoácidos esenciales requeridos para la dieta humana con el contenido de aminoácidos esenciales en semillas de amaranto (g/100 g de proteína). ....	8
Tabla 2.4 Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo.....	14
Tabla 5.1 Concentraciones de BSA para construir curva estándar .....	38
Tabla 6.1 Principales proteínas identificadas en las fracciones de proteínas de reserva de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . ....	53
Tabla 6.2 Secuencia de péptidos identificados por nLC-MS/MS en fracciones proteicas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> hidrolizadas con <i>L. plantarum</i> .....	90

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Planta y semillas del cultivo <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	5
Figura 2.2 Secuencias de péptidos bioactivos encontrados en la globulina 11S del amaranto.....	23
Figura 2.3 Modelo tridimensional de globulina 11S. a) Las porciones de hélice alfa están coloreadas en amarillo y hojas plisadas beta en magenta. b) Cada subunidad del trímero se representa con un color diferente .....	25
Figura 2.4 Sistema proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i> . D) representa el sistema de transporte de dipéptidos y tripéptidos y A) sistema de transporte de aminoácidos. .	28
Figura 5.1 Esquema general para la obtención de péptidos.....	36
Figura 5.2 Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa. ....	42
Figura 6.1 Porcentaje obtenido para cada fracción de proteínas de reserva a partir de harina de amaranto desengrasada. ....	49
Figura 6.2 Contenido de proteína en los liofilizados de las fracciones de proteínas de reserva de <i>A. hypochondriacus</i> . ....	50
Figura 6.3 SDS PAGE de las fracciones de proteínas de reserva de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . Estándar (STD), (A) fracción albúminas, (GO) fracción globulina, (7S-G) fracción globulinas 7S, (11S-G) fracción globulinas 11S y (GU) fracción glutelinas.....	52
Figura 6.4 Identificación de fases de crecimiento bacteriano con <i>L. plantarum</i> y <i>L. helveticus</i> en medio MRS por densidad óptica a 37 °C bajo condiciones anaerobias. Los datos presentados corresponden a la media de tres repeticiones experimentales. ....	55
Figura 6.5 Contenido de grupos amino libres después de 4 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) <i>L. helveticus</i> y b) <i>L. plantarum</i> en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).....	57

Figura 6.6 Contenido de grupos amino libres después de 8 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) <i>L. helveticus</i> y b) <i>L. plantarum</i> en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).....	59
Figura 6.7 Contenido de grupos amino libres después de 14 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) <i>L. helveticus</i> y b) <i>L. plantarum</i> en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).....	60
Figura 6.8 Contenido de grupos amino libres después de 24 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva semilla de amaranto con a) <i>L. helveticus</i> y b) <i>L. plantarum</i> en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).....	62
Figura 6.9 Contenido de grupos amino libres después de 48 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva semilla de amaranto con a) <i>L. helveticus</i> y b) <i>L. plantarum</i> en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).....	64
Figura 6.10 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente $\mu$ M Trolox/ g de proteína en fracciones proteicas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . Letras diferentes muestran una diferencia significativa (P <0.05).....	69
Figura 6.11 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente $\mu$ M Trolox en fracciones a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por <i>L. helveticus</i> y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por <i>L. plantarum</i> , todas con células en fase estacionaria temprana (14h). Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05)......	71
Figura 6.12 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente $\mu$ M Trolox/ g de proteína en fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G generados con <i>L. plantarum</i> . Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05)......	73
Figura 6.13 Captación de radicales hidroxilo ( $\bullet$ OH) en fracciones proteicas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> no hidrolizadas. Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05). .....	74

Figura 6.14 Captación de radicales hidroxilo de a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por <i>L. helveticus</i> y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por <i>L. plantarum</i> , todas con células en fase estacionaria temprana (14h). Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05).....	76
Figura 6.15 Captación de radicales hidroxilo de fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G generados con <i>L. plantarum</i> . Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05). ....	77
Figura 6.16 Capacidad de quelación de Zinc de las fracciones proteicas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> no hidrolizadas Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05).....	78
Figura 6.17 Capacidad de quelación de zinc de a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por <i>L. helveticus</i> y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por <i>L. plantarum</i> , todas con células en fase estacionaria temprana (14 h). Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05).....	80
Figura 6.18 Capacidad de quelación de Zinc de fracciones ultrafiltradas obtenidas de Glutelinas y 11S-G hidrolizadas durante 8 h con <i>L. plantarum</i> . Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05). ....	81
Figura 6.19 Actividad de Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en muestras de Albúminas y 11S-G hidrolizadas por <i>L. helveticus</i> y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por <i>L. plantarum</i> , todas con células en fase estacionaria temprana. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05).....	84
Figura 6.20 Inhibición de la ACE de fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G a 8 h generados con <i>L. plantarum</i> . Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos (P <0.05). ....	86

## **1 INTRODUCCIÓN**

Durante los últimos años se ha evidenciado que la dieta es un factor que afecta la incidencia de muchas enfermedades crónicas. La conciencia del efecto de la nutrición en la salud ha incentivado el desarrollo de productos promotores de la salud conocidos globalmente bajo el nombre de alimentos funcionales. Un alimento funcional como lo definió Stephen Defelice en 1989, son aquellos alimentos que aportan efectos benéficos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Defelice, 1995).

Las proteínas presentes en la dieta tienen como principal función formar y regenerar todos los tejidos del organismo. Pero también constituyen a la reserva energética del organismo y de aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de diversas funciones corporales; además, contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han adquirido un valor agregado debido al conocimiento de la actividad de los péptidos fisiológicamente activos (Vioque y Millán, 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006; Sarmadi y Ismail, 2010) . Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos (fragmentos específicos de la proteína) de bajo peso molecular, aparentemente inactivas dentro la proteína intacta pero que pueden ser liberados de sus proteínas de origen por diferentes medios. Se han encontrado péptidos bioactivos en proteínas de semillas, peces, huevo, soya y productos lácteos, entre otros (Moller *et al.*, 2008). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, estos péptidos pueden exhibir diversas actividades biológicas, incluyendo acción tipo opioide, antitrombótica, hipocolesterolemica, inmunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva. Muchos de los péptidos bioactivos conocidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados. Dado su potencial pueden ser considerados como componentes de alimentos funcionales. Estudios recientes han demostrado la

## Introducción

presencia de estos compuestos en las semillas del amaranto. El amaranto es una semilla perteneciente a la familia *Amarantaceae*. Es considerado un pseudocereal y contiene un importante valor nutritivo con alto contenido de proteína y excelente balance de aminoácidos. Las semillas presentan un contenido de proteína que oscila entre 12-18 % p/p (Barba de la Rosa *et al.*, 1992). El contenido de proteínas se incrementa hasta 20 % en las harinas desengrasadas y hasta 75 % en aislados proteicos de amaranto. La clasificación más usada (Osborne, 1924) para las proteínas de reserva en semillas, las organiza en cuatro grupos de acuerdo con su solubilidad: a) albúminas, solubles en agua o en buffers diluidos a pH neutro; b) globulinas, solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; c) prolaminas, se solubilizan en soluciones alcohólicas; d) glutelinas, proteínas solubles en álcalis o ácidos diluidos.

Se han reportado algunas actividades biológicas de las proteínas de la semilla de amaranto, tales como la disminución del contenido de colesterol en conejos hipercolesterolémicos (Plate y Arêas, 2002), propiedades antihipertensivas en la subunidad ácida de la globulina 11S, llamada amarantina (Morales-Camacho *et al.*, 2016) y actividad antioxidante en fracciones proteicas de semillas de *Amaranthus mantegazzianus* hidrolizadas con alcalasa, donde se han identificado la presencia de péptidos con actividad de captación de radicales libres (Tironi y Añón, 2010).

Actualmente se realizan investigaciones para la obtención de péptidos a partir de diferentes fuentes proteicas utilizando enzimas proteolíticas, con el propósito de identificar su bioactividad, determinar su estructura y conocer la relación entre estructura-función, aplicando estudios *in vivo* e *in vitro*.

El objetivo del trabajo se basó en la obtención de péptidos liberados mediante la hidrólisis con bacterias proteolíticas a partir de las fracciones proteicas de la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y la evaluación de sus posibles actividades biológicas.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Historia del cultivo de Amaranto

El amaranto es considerado un cultivo ancestral el cual ha sido usado por el hombre desde hace más de 6,000 años. Existe evidencia de que el amaranto ha existido en la dieta del humano desde la prehistoria, tanto en el sur de Asia como en el sur de América. El amaranto fue un cultivo muy importante para las culturas precolombinas como los Mayas, Aztecas e Incas (Jacobsen, 2002). Se cree que la domesticación de este cultivo en América ocurrió al mismo tiempo que la domesticación del maíz, y por lo tanto ambos cultivos formaron parte importante de la dieta y la cultura prehispánica (Marx, 1977). La palabra amaranto significa inmarcesible, que no se marchita; y viene del griego *Amaratón*, de *a* (sin) y *marainein* (marchitar). Los indígenas llamaban al amaranto *huautli* o *huauquilitl*, y los conquistadores lo denominaron *bledo* (Hernández y Herrerías, 1998). Estos pueblos consumían sus hojas verdes en forma de hortalizas y sus semillas en la forma de harinas. Con la llegada de los españoles al continente americano a finales del siglo XV, el cultivo de amaranto junto con el de otras especies autóctonas fue sustituido por el de otras especies y sólo se mantuvo su cultivo en pequeña escala para consumo propio. Gracias a que posee múltiples beneficios a la salud volvió a captar interés en años recientes y es actualmente estudiado principalmente como base para la elaboración de alimentos funcionales debido a la calidad nutricional del grano.

#### 2.1.1 Características del cultivo

El Amaranto es una planta de la familia *Amaranthacea* que incluye cerca de 60 géneros y más de 800 especies de plantas herbáceas. Las más apreciadas en México por su producción de semilla son: *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus*.

El amaranto pertenece al grupo de plantas C4, una modalidad fotosintética de alta eficiencia en el aprovechamiento de la radiación solar y de la fijación del dióxido de carbono presente en la atmósfera. Esta característica confiere adaptación a diversas condiciones climáticas muy adversas tales como la sequía, altas y bajas temperaturas y suelos salinos (Segura-Nieto, 1994). También se considera al amaranto como una planta dicotiledónea que produce semillas tipo cereal (generalmente clasificadas como monocotiledóneas) por lo que se le ha denominado como un pseudocereal puesto que produce granos tipo cereal. Su clasificación taxonómica es inexacta debido a su plasticidad botánica extrema, por lo que se han tomado en cuenta sus estructuras florales, forma y proporciones de la hoja e inflorescencias (Paredes López *et al.*, 1990).

El amaranto en su estado natural tiende a variar sus hojas, son simples, alternas, largamente aterciopeladas, son generalmente matizadas con un pigmento rojizo llamado amarantina, existen algunas con colores verde o beige y rojo púrpura, es una planta herbácea anual de 1.5 a 2 m de altura (Figura 2.1). La eficiencia del cultivo de amaranto es alta, ya que la recolección del grano se puede llevar a cabo 200 días después de su cultivo y se pueden obtener una recolección de 80 g de grano por cada planta. En particular el *A. hypochondriacus* es una planta herbácea anual de tallo simple o ramificado, sus hojas son elípticas con el ápice agudo y la base cuneada. La inflorescencia es de gran tamaño, con espigas y canículas laterales; es erecta y espinosa. La flor de esta especie presenta 5 tépalos, ligeramente curvados y más largos que los tépalos de otras especies para la producción de granos. Las semillas son de color blanco, dorado, café y negro.

De acuerdo con lo establecido por la FAO y OMS se le considera como un alimento de excelente calidad nutricional. Los rendimientos de amaranto pueden compararse con los rendimientos promedio de otros granos de interés comercial, como se observa en la Tabla 2.1.

El cultivo de amaranto también se puede comparar con los valores nutricionales de otros granos de los que se destacan sus beneficios debido a su contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Tabla 2.2).



Figura 2.1. Planta y semillas del cultivo *Amaranthus hypochondriacus*

Tabla 2.1 Rendimiento del cultivo de amaranto, algunos cereales y leguminosas

<b>Grano</b>	<b>Rendimiento (ton/ha)</b>
Amaranto	1.95
Trigo	1.81
Cebada	2.82
Avena	1.96
Maíz	4.23
Soya	1.65
Sorgo	3.26
Frijol	0.71

(SIAP, 2019)

Tabla 2.2 Análisis proximal del grano de amaranto (*A. hypochondriacus*) y otros cereales.

Análisis (%)	Amaranto (%)	Maíz (%)	Arroz (%)	Trigo (%)
Humedad	11.1	13.8	11.7	12.5
Proteína cruda	17.9	10.3	8.5	14.0
Grasas	7.7	4.5	2.1	2.1
Fibras	2.2	2.3	0.9	2.6
Cenizas	4.1	1.4	1.4	1.9
Hidratos de carbono	57.0	67.7	75.4	66.9

(FAO, 2010)

En la actualidad, este cultivo se produce principalmente en Puebla con una superficie de 2014 ha, Tlaxcala con 658 ha, Estado de México con 576 ha, Morelos con 255 ha, Ciudad de México con 142 ha, (con un promedio de 1 ha por productor y un rendimiento promedio de 0.975 toneladas por ha), Oaxaca con 77 ha, e Hidalgo con 6 ha, el rendimiento promedio es de 1.82 t/ha (SAGARPA, 2018).

## 2.2 Semilla del Amaranto

Las semillas de amaranto tienen un tamaño de entre 1 y 2 mm de diámetro. Sus semillas varían de color según la especie, y pueden ser blancas, negras, doradas, o moradas. El centro de la semilla se denomina perispermo y es el tejido principal de almacenamiento, consiste en células del parénquima llenas de gránulos de almidón poliédricos. La mayor parte de las proteínas de reserva se encuentran contenidas en cuerpos proteínicos de aproximadamente 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro en el embrión y de menor tamaño en el endospermo. El componente principal de la semilla de amaranto es el almidón, que representa entre el 50 y 60% de su peso seco. El diámetro del gránulo de almidón posee un tamaño de entre 1-3  $\mu\text{m}$ , mucho menor que el de otras especies vegetales, motivo por el cual su digestión se ve facilitada (Paredes López *et al.*, 1990).

La semilla de amaranto contiene entre un 13 % y 19 % de proteína. Su valor nutricional se centra en su contenido de aminoácidos esenciales como: histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, valina y lisina (Mota *et al.*, 2016). Su alto contenido en lisina y metionina lo hace un alimento ideal para combinarse con cereales y leguminosas, debido a que éstos últimos son deficientes precisamente en esos aminoácidos respectivamente. Así mismo, el amaranto es deficiente en triptófano, aminoácido abundante en los cereales, de manera que la combinación de cereales con amaranto permite un balance de aminoácidos bastante equilibrado. Por otro lado, se sabe que la proteína del amaranto es fácilmente digerible, y que aproximadamente un 90% del contenido de éste se hidroliza y puede ser absorbido eficientemente. Cabe mencionar que muchos de los productos de la digestión proteica del amaranto tienen utilidad funcional para el organismo regulando procesos de proliferación celular e inflamación, además de contribuir como fuente de aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas (Paško *et al.*, 2011).

La calidad de la proteína del amaranto en función de su perfil de aminoácidos lo hace particularmente apto para el consumo humano (Tabla 2.3). La FAO ha establecido un patrón ideal de aminoácidos que se deben de consumir en la dieta diaria, al amaranto se encuentra dentro del rango óptimo requerido para la dieta (Paredes López *et al.*, 1990; Segura-Nieto, 1994).

Tabla 2.3 Comparación de aminoácidos esenciales requeridos para la dieta humana con el contenido de aminoácidos esenciales en semillas de amaranto (g/100 g de proteína).

Aminoácido	Amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	FAO	
		Adultos	Niños
Isoleucina	2.8-3.8	1.3-4.6	1.3-4.6
Leucina	5.0-5.8	1.9-9.3	1.9-9.3
Lisina	3.2-6.0	1.6-6.6	1.6-6.6
Metionina	2.6-5.5	1.7-4.2	1.7-4.2
Fenilalanina	6-9-8.5	1.9-7.2	1.9-7.2
Treonina	2.6-4.3	0.9-4.3	0.9-4.3
Triptófano	1.1-4.3	0.5-1.7	0.5-1.7
Valina	3.2-4.2	1.3-7.2	1.3-7.2

(FAO, 2010)

También está demostrado que el consumo de la semilla del amaranto ayuda a disminuir el colesterol y los triglicéridos, mejora el metabolismo de la glucosa y de los lípidos y ayuda a aumentar la concentración de Ca y P en los huesos (Martirosyan *et al.*, 2007). En México se utiliza en una amplia variedad de alimentos, entre ellos de confitería y bebidas tradicionales a base de amaranto.

### 2.2.1 Proteínas de reserva

Las proteínas de la semilla se pueden clasificar en dos grupos: proteínas constitutivas y proteína de reserva. Las proteínas constitutivas son las responsables del mantenimiento del metabolismo celular. Las proteínas de reserva se caracterizan por tener altos pesos moleculares y ser poco solubles en agua; tienen como función única el proveer proteínas como fuente de nitrógeno y azufre durante la germinación y el desarrollo de una nueva planta (Shewry *et al.*, 1995), por lo que se encuentran en grandes cantidades acumuladas en la semilla en desarrollo y depositadas en cuerpos proteicos los cuales son hidrolizados durante la germinación. Estas proteínas carecen

de otra función y son sintetizadas únicamente en la semilla, particularmente en el cotiledón o en el endospermo. Estas reservas son movilizadas en el momento de la germinación y sus catabolitos son utilizados para mantener el crecimiento de la semilla hasta que esta pueda establecerse por sí sola como una planta fotosintética autotrófica. Las proteínas de reserva en su mayoría se encuentran depositadas en estructuras llamadas organelos o vacuolas de almacenamiento (Bewley y Marcus, 1990). Las vacuolas de almacenamiento tienen dos rutas diferentes dependiendo del tipo de proteínas que contengan, en el caso de las prolaminas, éstas se dirigen directamente a la vacuola de almacenamiento; para el caso de las albúminas, globulinas y glutelinas pasan al aparato de Golgi para finalmente depositarse o colocarse en las vacuolas de almacenamiento (Frigerio *et al.*, 2008).

Existen varios tipos de clasificaciones para las proteínas de reserva de semillas. La más usada es la propuesta por Osborne en 1924. En esta clasificación las proteínas de reserva se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo con su solubilidad. Los cuatro grupos son: a) albúminas, que son solubles en agua y en buffers diluidos a pH neutro; b) globulinas, solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; c) prolaminas, que solubilizan en soluciones alcohólicas entre (70-90%); y d) glutelinas, son proteínas solubles en álcalis o ácidos diluidos.

La fracción proteica más abundante en las semillas de amaranto son las albúminas (48.9-65%), seguido por las glutelinas (22.4-42.3%). Las globulinas representan el 13.7-18.1% del total de las proteínas y la fracción menos abundante son las prolaminas tan solo 1-3.2% (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Segura-Nieto, 1994). Sin embargo, existe una controversia sobre cuál de estas fracciones es el principal componente. La proporción de las diferentes fracciones en un aislado proteico de amaranto y sus propiedades funcionales y nutricionales particulares depende del método de extracción utilizado (Martínez y Añón, 1996).

Bressani y Garcia-Vela (1990) evaluaron las tres especies más difundidas de amaranto: *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. Realizaron una prueba

usando una solución de NaCl como primer solvente de extracción y luego agua; la fracción de globulinas fue predominante en el grano, siendo 41 % del total de proteínas, seguida de glutelinas (31 %), prolaminas (10 %) y albúminas (8,4 %). En tanto, si el orden de extracción fuera invertido, la fracción albúmina pasa a ser un 20 % de las proteínas y las globulinas un 19 %. Aplicando otros métodos de extracción (Correa *et al.*, 1986), usaron una compleja técnica de fraccionamiento, de la cual se obtuvo la siguiente distribución: 65 % de albúminas, 17 % de globulinas, 11 % de prolaminas y 7 % de glutelinas. Estas mismas proporciones fueron obtenidas por (Breene, 1991). Otros autores concuerdan que las mayores fracciones son de albúmina y globulinas y que la menor fracción proteica es de prolaminas (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Caselato-Sousa y Amaya-Farfan, 2012).

Se han realizado estudios de composición de aminoácidos y patrones electroforéticos de las fracciones proteicas totales presentes en el grano, así como de perfil de carga, asociación covalente de subunidades (Bressani y Garcia-Vela, 1990) y estudios calorimétricos y electroforéticos (Martínez *et al.*, 1997). En cuanto al patrón electroforético de las proteínas de reserva se sabe que presentan características similares. Las albúminas tienen un peso molecular de 18 a 21 kDa; una característica de sus secuencias es que cuenta con 8 residuos de cisteína que forman 4 puentes disulfuro. Esta fracción está compuesta por polipéptidos de diversos tamaños la mayoría entre 10 y 43 kDa ( Segura-Nieto *et al.*, 1992, Marcone, 1999), encontrándose también polipéptidos de 94 kDa de peso molecular (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Martínez y Añón, 1996; Konishi *et al.*, 2014). Las albúminas se clasifican de dos tipos: albúmina 1 extraída de la harina con soluciones acuosas o sales y albúmina 2, obtenida por extracción acuosa después de la extracción de la albúmina 1 (Segura-Nieto, 1994; Gorinstein *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997). Dichas fracciones proteicas presentan diversos patrones de distribución de aminoácidos: las albúminas contienen altas proporciones de ácido glutámico y aspártico, así como de lisina y valina.

Las globulinas en el amaranto corresponden del 20 al 60% del total de las proteínas. La fracción de globulina está compuesta de globulina 11S (amarantina),

globulina P (globulina I o albúmina 2) y cantidades pequeñas de globulina 7S (conamarantina) (Avanza y Añón, 2007). La globulina 11S tiene una masa molecular de 389 kDa y características moleculares semejantes a las globulinas de las leguminosas (Marcone y Yada, 1991; 1992; Castellani *et al.*, 2000), con una estructura cuaternaria dodecamérica formada por subunidades ácidas (peso molecular de 30 a 40 kDa) y subunidades básicas (peso molecular alrededor de 20 kDa) unidas por enlace disulfuro (Segura-Nieto, 1994). La globulina P está compuesta de moléculas unitarias con masa molecular y composición de polipéptidos semejante a la globulina 11S, en tanto que la globulina P posee alta entalpía de desnaturalización, baja solubilidad en solución acuosa neutra, tiende a polimerizar y contiene mayor proporción de subunidades monoméricas de 54 kDa que la globulina 11S (Martínez *et al.*, 1997). La globulina 7S de amaranto ha sido caracterizada como un heterooligómero con masa molecular de 186 kDa formada por ocho subunidades diferentes tamaños entre 15 y 90 kDa unidas por enlaces no covalentes (Marcone, 1999). Según Segura-Nieto (1994), las glutelinas poseen características moleculares semejantes a la globulina 11S.

El amaranto posee otra fracción de globulinas, descrita por primera vez por Konishi *et al.*, (1991), la cual denominó albúmina 2. Es una proteína tipo 11S, soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores que 0,1M. Su *pI* se encuentra entre 5 y 6 y su composición polipeptídica es igual a la de la globulina 11S, pero con mayor proporción de las subunidades de 56 kDa no diméricas (Konishi *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1997). Una característica particular de esta proteína es su alto grado de polimerización con sólo aproximadamente un tercio de sus moléculas no agregadas. Las mismas mostraron una masa molecular cercana a 300 kDa. Teniendo en cuenta sus aspectos moleculares y su presencia en cuerpos proteicos se ha sugerido la denominación de globulina polimerizada (Gp) (Martínez *et al.*, 1997; Castellani *et al.*, 1998; Castellani *et al.*, 2000).

La fracción de las prolaminas se encuentra en muy baja proporción en el amaranto. Se ha descrito que esta fracción está constituida por polipéptidos de bajo peso molecular (entre 22 y 10 kDa) (Castellani *et al.*, 2000). Esta fracción posee dominios repetidos de prolina y glicina, seguidos de dominios ricos en cisteína homólogos a los dominios de albúmina. Las glutelinas de amaranto representan el 18% de las proteínas de reserva, si bien se diferencian de las globulinas por ser solubles sólo a pHs extremos presentan composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina P (Abugoch James, 2006). Las glutelinas se dividen en dos grupos las de bajo peso molecular (35-28 KDa) y las de alto peso molecular que a su vez se subdividen en las de tipo x que tienen pesos moleculares de 88 a 83 KDa y las del tipo y que presentan pesos moleculares entre 74-67 KDa (Maldonado-Cervantes *et al.*, 2014). En medio desnaturante en presencia de 2-mercaptoetanol se observan polipéptidos de masas moleculares semejantes a las globulinas, en general se detecta una banda entre 60-54 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 38-35kDa y 26-24 kDa respectivamente (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Gorinstein *et al.*, 2001).

### 2.3 Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos son pequeñas cadenas peptídicas, permanecen inactivos dentro de la proteína intacta, pero pueden ser liberados tras la hidrólisis de la proteína ejerciendo diversos efectos beneficiosos para el organismo (Vioque *et al.*, 2000). Kitts y Weiler, 2003 mencionan que los péptidos bioactivos obtenidos de los alimentos pueden presentar entre 2 y 9 residuos de aminoácidos. Sin embargo, existen excepciones ya que se han identificado péptidos con más de 20 residuos de aminoácidos, como el péptido lunasin, el cual fue extraído por primera vez de la soya y presenta actividad anticancerígena; este posee 43 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5400 Da (Jeong *et al.*, 2009). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos en el péptido, su administración oral podría influir sobre alguno de los principales sistemas del organismo: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (Korhonen y Pihlanto, 2006; Hartmann y Meisel, 2007). Es decir, la actividad

biológica de los péptidos está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman (Torres-Llanez *et al.*, 2005).

Existe la evidencia de que las proteínas y los péptidos derivados de ellas, exhiben una serie de actividades biológicas con efecto directo sobre los procesos fisiológicos del organismo, más allá de su aporte nutrimental (Iwaniak y Minkiewicz, 2007). Los péptidos con actividad biológica han sido aislados principalmente a partir de hidrolizados proteínicos y de productos lácteos modificados por fermentación bacteriana, pero también se pueden generar durante la digestión gastrointestinal por efecto de las enzimas digestivas. Los péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, del tracto gastrointestinal y a nivel sistémico (Chatterton *et al.*, 2006). Estas secuencias de aminoácidos tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor; también pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo controlando glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, la memoria, el dolor, el apetito y sobre las vías de estrés del sistema nervioso central, ejerciendo su actividad a diversos órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Vermeiren *et al.*, 2004).

Las funciones de los péptidos bioactivos como antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, anticariogénicos, antiulcerativos y antitrombóticos, por mencionar algunas, permiten su uso como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales y con ello obtener un efecto benéfico en la salud o reducir el riesgo de padecer alguna enfermedad.

### 2.3.1 Clasificación de péptidos bioactivos

Rutherford-Markwick y Moughan (2005) agruparon los péptidos bioactivos de acuerdo con su actividad biológica general. Los grupos propuestos se describen en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo

<b>Péptidos</b>	<b>Efecto en el organismo</b>
Inmunomoduladores	Son péptidos que estimulan o modulan el sistema inmunológico.
Antihipertensión	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores-ACE (enzima convertidora de angiotensina); inhiben las enzimas ACE I y II, que están involucradas en el sistema renina-angiotensina, el cual regula la presión sanguínea. Los vasorelajadores por su parte actúan mediando los receptores Bradiquinina B1, prostacilina y un receptor desconocido de óxido de nitrógeno.
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y de envejecimiento.
Reguladores de funciones gastrointestinales	Mejoran la digestión y absorción. Estos péptidos tienen una acción específica y localizada en el intestino, mediante la regulación de hormonas del intestino o actuando específicamente in situ después de la absorción.
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones. Como su nombre lo indica, combaten una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también algunas levaduras y hongos.
Reguladores de la integridad intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos. Este grupo está formado por algunos factores de crecimiento y péptidos que ayudan a mantener la integridad intestinal y previenen algunas inflamaciones.
Reguladores de colesterol	Son todos aquellos que ayuden a controlar o disminuir los niveles de colesterol en sangre.
Opioides	Son péptidos que pueden afectar el apetito, el comportamiento y la movilidad gastrointestinal y pueden exhibir efectos tipo morfina (analgésicos potentes).
Antitrombóticos	En este grupo se encuentran los péptidos que ayudan disminuir los riesgos de una trombosis, se incluyen todos aquellos péptidos que inhiben la formación de agregados de plaquetas vía la desactivación de las plaquetas activadas con ADP (adenosina difosfato).
Anticancerígenos	Reducen los riesgos de padecer cáncer. El péptido Lunasin fue identificado en soya y recientemente en fracciones proteicas del amaranto.

(Rutherford-Markwick y Moughan, 2005)

### 2.3.2 Actividades biológicas identificadas en péptidos

Las proteínas de procedencia animal y/o vegetal han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos o por acción de las

bacterias ácido lácticas (Korhonen y Pihlanto, 2003) dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado o bacterias y de las condiciones de procesado, la actividad biológica de los péptidos obtenidos es distinta (Wang y De Mejia, 2005). Los péptidos bioactivos se producen a partir de la hidrólisis de proteínas, la cual puede ocurrir de tres maneras: por hidrólisis con enzimas digestivas, por la hidrólisis con microorganismos proteolíticos o por la acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas. Los péptidos con actividad biológica también se producen a partir de las proteínas de los alimentos durante la digestión gastrointestinal y la fermentación de alimentos con bacterias ácido lácticas (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Entre las proteínas de origen vegetal de las que se han aislado péptidos bioactivos se encuentran las proteínas de soja, trigo, maíz, arroz, amaranto, alpiste, nuez, cebada y girasol (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Wang y De Mejia, 2005). En cuanto a las proteínas de origen animal, la leche y otros productos lácteos son los precursores de los péptidos bioactivos más estudiados, aunque también se han identificado estos péptidos en la ovoalbúmina de huevo, en la carne (Korhonen y Pihlanto, 2003) en el músculo de pescado (sardina, atún) (Yamamoto *et al.*, 2003) y en la jalea real (Matsui *et al.*, 2002).

#### 2.3.2.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva, lo que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (López Expósito y Recio, 2006). Estos péptidos oscilan entre 2 hasta 20 aminoácidos. Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada *in vitro* de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Los péptidos con actividad antimicrobiana inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos péptidos tienen un amplio espectro de actividad, matando o neutralizando muchas bacterias Gram-negativas y

Gram-positivas, incluyendo algunas cepas resistentes a antibióticos, como también hongos, virus y parásitos (Hancock, 2001).

Se sabe que las proteínas de la leche, animal o humana, poseen propiedades antibacterianas conferidas por algunas proteínas tales como lactoferrina, inmunoglobulinas y péptidos que se generan al hidrolizar otras proteínas lácteas. Se han reportado otros péptidos con actividad bactericida como los hidrolizados de proteína de huevo. Los péptidos antimicrobianos pueden actuar de muchas formas sobre células bacterianas; por ejemplo, activan enzimas que provocan lisis celular, forman poros a través de la membrana, inhiben la síntesis de ácidos nucleicos o por el efecto sinérgico con otras moléculas del sistema inmune (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2008; Lohner y Blondelle, 2005). La actividad de alcalasa, tripsina o pepsina sobre  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) dio como resultado fragmentos bacteriostáticos contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (El-Zahar *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.2 Péptidos inmunomoduladores

Los péptidos modulan las funciones del sistema inmune ya sea activando la respuesta contra la presencia de microorganismo patógenos o evitando la respuesta inflamatoria. Su acción se evidencia mediante la medida de la proliferación de linfocitos, la actividad de las células NK (natural killer), la producción de anticuerpos y la regulación de la producción de citoquinas. Además, reducen la respuesta inflamatoria en reacciones alérgicas y modulan la inmunidad de mucosas. En cuanto a su actividad inmunomoduladora no se tiene claro el mecanismo de acción, pero se ha observado que existen péptidos derivados de la hidrólisis de  $\beta$ -caseína y  $\alpha$ -caseína capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo y ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones (Vioque y Millán, 2005). Algunas investigaciones sugieren que la actividad inmunomoduladora de los péptidos es consecuencia de su actividad antimicrobiana.

Se ha propuesto que estos péptidos pudiesen interactuar con el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) (Kayser y Meisel, 1996). Mercier *et al.*, (2004) reportaron que algunos péptidos de cadena corta (<5 kDa) obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero de leche, estimulan la proliferación de las células del sistema inmunológico. Por otra parte, los péptidos liberados de las proteínas del suero debido a la acción de proteasas intestinales pueden estimular el sistema inmunológico aumentando significativamente la secreción de citoquina Th1, teniendo un efecto importante en la lucha contra las infecciones del sistema inmunológico (Saint-Sauveur *et al.*, 2008).

### 2.3.2.3 Péptidos antihipertensivos

En los últimos años se ha reconocido que existen factores nutricionales que participan en la prevención o tratamiento de la hipertensión; por lo tanto, muchas investigaciones se han enfocado al estudio de fuentes alimenticias con actividad antihipertensiva. Los péptidos antihipertensivos generan esta bioactividad, por esta razón éstos, han sido los más estudiados debido a la incidencia de la hipertensión entre la población, ya que este padecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La enzima conocida como enzima convertidora de la angiotensina (ACE; peptidildipéptido hidrolasa, ECA) juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea en mamíferos, ayuda a catalizar la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en el potente vaso constrictor angiotensina II (octapéptido), y al mismo tiempo inactivar al vasodilatador bradiquinina (Erdmann *et al.*, 2008a). La ACE tiene dos isoformas, transcritas por el mismo gen, una expresada en la mayoría de los tejidos y distribuida en varias células, así como en los fluidos extracelulares como el plasma, y se denomina ACE somática (sACE). La segunda isoforma se denomina testículo ACE (tACE) y se encuentra en testículos de adultos (Pan *et al.*, 2011). ACE consta de dos dominios, que son el dominio N y el dominio C y ambos contienen un sitio activo de unión al cofactor de zinc; por esa razón, los agentes quelantes de metales pueden inhibir la ACE (Deddish *et al.*, 1994; Aluko, 2015). Se han identificado péptidos antihipertensivos aislados de leche, ovoalbúmina,

pescado, carne de res, carne de pollo, soya, arroz, amaranto, entre otras (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2011). Los péptidos que inhiben la ACE o antihipertensivos son generalmente péptidos de cadena corta que contienen residuos de aminoácidos polares como la prolina y/o aminoácidos aromáticos con estructuras ramificadas cuyas interacciones electroestáticas con el centro activo de la enzima provocan la inhibición de la actividad (Hartmann y Meisel, 2007).

#### 2.3.2.4 Péptidos antioxidantes

Las especies reactivas al oxígeno (ROS) pueden causar daños a las macromoléculas biológicas como el ADN, las proteínas y los lípidos pudiendo así jugar un papel significativo en el desarrollo de enfermedades. El consumo de antioxidantes presentes en alimentos de origen animal o vegetal parecen ofrecer mayores beneficios contra el estrés oxidativo (Fang *et al.*, 2002). Los radicales libres causan en un producto alimenticio la oxidación de lípidos, desarrollando rancidez y reduciendo la vida útil del alimento. En las células, los radicales libres son moléculas que están en continua formación y son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades (Bray, 2000). Los péptidos antioxidantes presentan pesos moleculares de 4 a 20 kDa y tienen la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica.

La actividad antioxidante se ha atribuido a ciertas secuencias de aminoácidos como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano (Peña-Ramos *et al.*, 2004). Se cree que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen histidina está relacionada con la capacidad de este aminoácido a donar hidrógeno y con la capacidad quelante de iones metálicos del grupo imidazol o también por los aminoácidos azufrados presentes en las cadenas laterales (Elias *et al.*, 2008). Se han identificado diferentes secuencias peptídicas derivadas de la hidrólisis de  $\alpha$ -caseína que poseen actividad antioxidante ya que previenen la oxidación enzimática que provoca la

lipoxigenasa sobre los ácidos grasos (FitzGerald *et al.*, 2004). Se presume que aminoácidos hidrofóbicos como Leu, Val y Ala están presentes en las secuencias de los péptidos (Marcuse, 1962). Los factores que pueden afectar la actividad antioxidante de hidrolizados obtenidos a partir de proteínas alimentarias incluyen la especificidad de la enzima, el grado de hidrólisis y las propiedades estructurales de los péptidos resultantes como tamaño molecular, hidrofobicidad y composición de aminoácidos (Chakrabarti *et al.*, 2014; Esfandi *et al.*, 2019a).

#### 2.3.2.5 Péptidos anticancerígenos

El lunasin es el primer agente antimitótico aislado de una fuente común de alimentos (soya) conocido por sus propiedades anticancerígenas. Es un péptido de 43 aminoácidos que tiene un peso molecular de 5kDa y su secuencia es SKWQHQQDSCRKQKQGVNLT PCEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD. Este péptido se identificó inicialmente en el cotiledón de la soya cuando se clonó un gen que codificaba una albúmina 2S procesada post-traduccionalmente (Gm2S-1) a partir de semillas de soya de maduración media (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2013). Este péptido contiene 9 residuos de ácido aspártico en el extremo C-terminal, un tripéptido arginina-glicina-acido aspártico (de Mejia *et al.*, 2010). En ausencia de carcinógenos, el lunasin suplementado exógenamente no tiene ningún impacto visible en la morfología celular, pero obstaculiza selectivamente la transformación en su presencia. Los estudios preliminares sobre su actividad biológica revelaron que el lunasin provoca detenciones mitóticas que conducen a la muerte celular por la unión visible a las regiones del cinetocoro del centrómero y obstruyendo la unión de los microtúbulos y formando filamentos no separados en *E. coli*. Esto indica que la posible actividad anticancerosa del lunasin podría ser útil como agente terapéutico (Lule *et al.*, 2015). Después de la soya, solo existe un reporte de la presencia de lunasin en cebada, y actualmente ha sido reportado en otras fuentes biológicas como el amaranto (Silva-Sanchez *et al.*, 2008).

### 2.3.3 Obtención de péptidos bioactivos

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos bioactivos pueden ser obtenidos por diferentes métodos, ya sea por hidrólisis enzimática, por fermentación con bacterias proteolíticas o por acción de las enzimas derivadas de microorganismos; incluso con la combinación de estos métodos. Los péptidos bioactivos que proceden de la leche y sus derivados son los más estudiados.

Muchos de los cultivos lácteos usados en la industria son altamente proteolíticos; debido a esto, se pueden obtener péptidos bioactivos por el sistema proteolítico de bacterias durante la fermentación de productos lácteos (Korhonen y Pihlanto, 2006). Durante el proceso fermentativo, tanto el sistema proteolítico de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores como el de la microbiota endógena potencialmente presente en el sustrato alimentario, se encargan de la hidrólisis de las proteínas de la leche o de algunas otras fuentes como los cereales (Fitzgerald y Murray, 2006). La hidrólisis de una proteína es un método simple y de bajo costo para convertir una proteína en aminoácidos libres y polipéptidos de cadena corta. Los cuales son mucho más solubles en agua que la proteína original, sin embargo, su composición de aminoácidos permanece esencialmente sin cambios. Un gran número de estudios han sido realizados en la preparación de hidrolizados de diferentes fuentes de proteínas, en un esfuerzo para entender mejor sus propiedades y evaluar sus funciones biológicas (Cumby *et al.*, 2008). Existen varios ejemplos de péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la leche por medio de la proteólisis microbiana o enzimas digestivas.

Borjórquez-Balam *et al.*, (2013) evaluaron la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Ellos reportaron que el concentrado proteínico de *P. lunatus* fue adecuado para generar hidrolizados limitados vía hidrólisis enzimática *in vitro*, empleando pepsina y pancreatina, y el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina. Obtuvieron dos fracciones a partir de la porción soluble del hidrolizado, la cual fraccionaron empleando

una celda de ultrafiltración, una > 10 kDa y una < 10 kDa. El hidrolizado y las fracciones peptídicas, presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. flexneri*. La mayor actividad antimicrobiana la presentó la fracción < 10 kDa con una concentración mínima de inhibición de 392.04 µg/mL contra *S. aureus* y 993.17 µg/mL contra *S. flexneri*.

Rojas-Ronquillo *et al.*, (2012) realizaron un estudio monitoreando fermentaciones en suero de leche y caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*; tomando en cuenta la concentración de grupos amino libres como indicador de proteólisis. Determinaron la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de evitar la formación de un coágulo hemático inhibiendo la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, de las muestras tomadas durante las fermentaciones. Las muestras que presentaron mayor capacidad de inhibición de la ACE fueron las de la fermentación en suero de leche con ambas bacterias; en el caso de la actividad antitrombótica sólo se observó actividad durante la fermentación en caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota. Se identificaron dos péptidos inhibidores de la ACE y cinco inhibidores de la trombina. El único péptido generado a partir de la caseína fue YQEPVLGPVRGPFPIIV, reportado como multifuncional el resto de los péptidos se generaron de proteínas constitutivas de *Lactobacillus casei*.

LeBlanc *et al.*, (2002), estudiaron el efecto de los péptidos liberados durante la fermentación láctica sobre el sistema inmune humoral y en el crecimiento del fibrosarcoma. Se demostró que el *Lactobacillus helveticus* es capaz de liberar compuestos peptídicos durante la fermentación de la leche debido a su alta actividad proteolítica. Se sabe que estas bacterias lácticas tienen alta actividad proteolítica, causando la liberación de oligopéptidos de digestión de proteínas de la leche. Estos oligopéptidos pueden ser una fuente directa de péptidos bioactivos después de la hidrólisis por las enzimas gastrointestinales. Varios péptidos de caseína derivados pueden desempeñar un papel en la modulación del sistema inmune. Los fragmentos de β-caseína han demostrado estimular la fagocitosis de los glóbulos rojos de ovejas por los macrófagos peritoneales, así como proteger contra infecciones, mejorar la

proliferación de linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* y aumentar la proliferación de linfocitos de sangre periférica murina *in vivo*.

Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2011, determinaron la concentración de péptidos de proteínas de leche liberados por la actividad proteolítica de las bacterias *L. casei* y *L. acidophilus* durante su almacenamiento en refrigeración. Se encontraron péptidos de peso molecular menores a 14.4 kDa. Las leches fermentadas con *L. casei* presentaron mayor concentración de péptidos; mientras que las leches fermentadas con *L. acidophilus* presentaron una variedad de péptidos. La comparación del perfil de péptidos permitió comprobar que los péptidos generados dependen del microorganismo utilizado en la fermentación. Se identificaron tres péptidos que podrían tener actividad antihipertensiva, ya que los pesos moleculares reportados en otros estudios son muy similares a los pesos moleculares determinados y en ellos hay presencia de Tyr, Phe y Trp.

#### 2.3.4 Péptidos bioactivos en el amaranto

Existen numerosos trabajos que indican la presencia de péptidos bioactivos en las proteínas de semillas de amaranto entre los que se destacan se encuentran: péptidos con propiedades inhibitorias de la enzima convertidora de la angiotensina, péptidos con propiedades preventivas de cáncer tipo lunasin, y péptidos inhibidores de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV) (Silva-Sanchez *et al.*, 2008).

Montoya-Rodríguez *et al.*, (2015), mediante un estudio *in silico* determinaron las principales actividades biológicas presentes en las proteínas del amaranto que estuvieran relacionadas con la prevención de enfermedades cardíacas, cancerígenas o en relación con diabetes. Las principales proteínas del amaranto, incluyendo a las proteínas de reserva globulinas 7S y 11S fueron evaluadas usando la base de datos BIOPEP, mostrando que dentro de estas proteínas se encuentran secuencias de péptidos con actividades antioxidantes, de inhibición de enzima ACE, inhibidores de la enzima DDP IV; entre otras. Se usó como referencia la secuencia de péptidos de la

globulina 11S demostrando que en ella se encuentran péptidos con función biológica podrían ayudar a prevenir enfermedades crónicas (Figura 2.2).

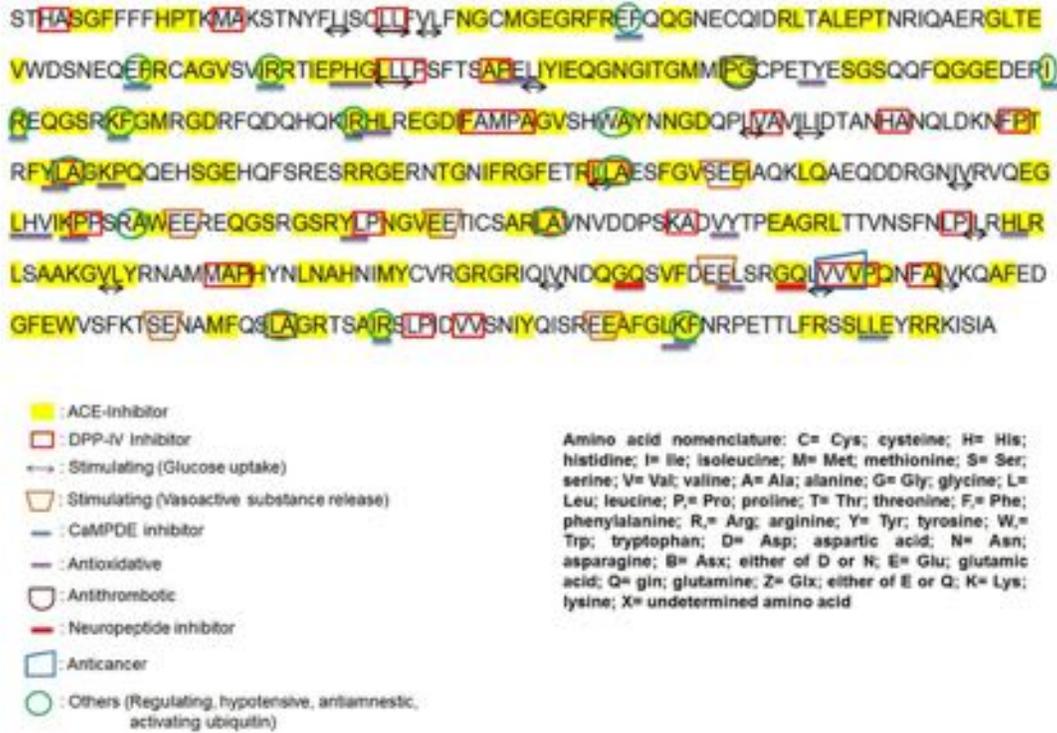


Figura 2.2 Secuencias de péptidos bioactivos encontrados en la globulina 11S del amaranto

Montoya-Rodríguez *et al.* (2015)

Velarde-Salcedo *et al.*, 2013 determinaron la capacidad de inhibición de la enzima DPP IV, la cual es una enzima clave en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Encontraron que con la digestión con tripsina como la simulación completa de la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto liberan péptidos menores de 10 KDa. Los péptidos obtenidos de la fracción de glutelinas pueden inhibir el 60% de enzima DPP IV; además que son capaces de disminuir la acumulación de grasa de adipocitos de ratón y disminuyen la diferenciación de sus células precursoras.

Tironi y Añón, 2010 demostraron la presencia de péptidos con capacidad antioxidante del Amarantho (*Amaranthus mantegazzianus*). Estos se distribuyen en las diferentes fracciones de albúminas, globulinas y glutelinas, siendo la fracción de glutelinas la que mostró la mayor actividad. Se demostró que la hidrólisis con alcalasa mejora la actividad antioxidante de las fracciones, siendo los péptidos con peso molecular menor a 500 Da los más activos y la fracción peptídica con peso molecular menor a 250 Da no tuvo una buena capacidad de captación de radicales libres, pero si de prevenir la oxidación del ácido linoléico, sin embargo, la secuencia de aminoácidos no ha sido reportada.

Vecchi y Añón, (2009) fueron los primeros en reportar actividad antihipertensiva de la globulina 11 S del *Amaranthus hypochondriacus* usando un método *in silico* con ayuda de la base de datos BIOPEP. Construyeron un modelo tridimensional de la proteína globulina 11S, sobre el cual los péptidos antihipertensivos fueron mapeados a través la base de datos, encontrando dos tripéptidos: IKP y LEP (Figura 2.3). Modelaron una extensión N-terminal de estos dos péptidos utilizando la información de la secuencia primaria de la globulina 11S, y simularon el comportamiento de inhibición de la ACE mediante acoplamiento automatizado de ligando-proteína.

La aparición de dos tetrapéptidos inhibidores, ALEP y VIKP, se predijo y validó experimentalmente mediante un ensayo *in vitro* de inhibición de la ACE, mostrando que estos tetrapéptidos son capaces de inhibir la actividad de la enzima ACE. A pesar de que está demostrado que dentro de las secuencias de las proteínas de amaranto existen péptidos con actividad de captación de glucosa hasta ahora no existen estudios que reporten dicha actividad en este cereal.

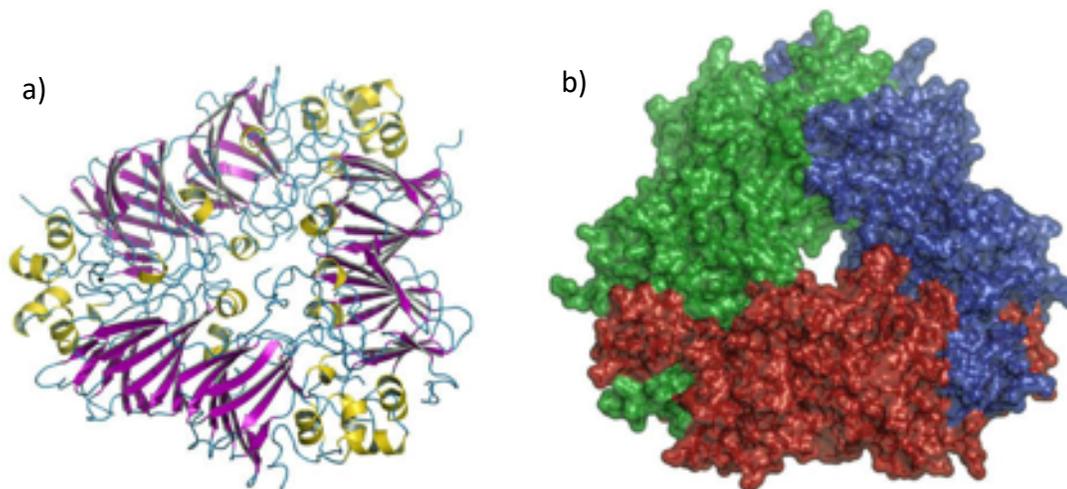


Figura 2.3 Modelo tridimensional de globulina 11S. a) Las porciones de hélice *alfa* están coloreadas en amarillo y hojas plisadas *beta* en magenta. b) Cada subunidad del trímero se representa con un color diferente

(Vecchi y Añón, 2009)

Hasta ahora, Ayala-Niño *et al.*, (2019b) han reportado la obtención de péptidos con actividad biológica a partir de la fermentación de la proteína total de amaranto con *Lactobacillus casei Shirota* y *Streptococcus thermophilus* 54102 en monocultivo y cultivo combinado. El aumento de los grupos amino libres durante la fermentación estuvo relacionado con las actividades antihipertensivas y antioxidantes, donde los valores más altos se encontraron en la fermentación con cultivo combinado. Por el contrario, la actividad antitrombótica no mostró relación con los grupos amino libres durante la fermentación, teniendo la mayor bioactividad en diferentes tiempos durante de la fermentación con *L. casei Shirota* y *S. thermophilus*.

#### 2.4 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas desempeñan un papel clave en los procesos de fermentación; son utilizadas en gran escala para la producción de alimentos debido a que ayudan a preservar la textura, sabor, olor y aromas de los alimentos fermentados. Las bacterias del género *Lactobacillus* tienen múltiples requerimientos para un

crecimiento normal. Ellas necesitan de un suministro exógeno de factores de crecimiento esenciales como purinas, vitaminas, glucosa y aminoácidos libres como: arginina leucina, isoleucina, metionina, lisina, valina, ácido glutámico, ácido aspártico, tirosina, treonina y triptófano (Axelsson y Ahrné, 2000).

En general las bacterias ácido lácticas son un grupo relativamente heterogéneo de bacterias Gram+, las cuales pueden ser cocos o bacilos. Son habitantes de diversos nichos ecológicos entre los que destacan: alimentos, la boca, el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales. Comparten también ciertas características que las definen como grupo, entre las que destacan: 1) Tienen una alta tolerancia a medios ácidos, 2) Carecen de citocromos, 3) Son organismos que no forman esporas, 4) Presentan una gran cantidad de auxotrofias y por lo tanto son nutricionalmente exigentes, 5) Son aerotolerantes, pero no son microorganismos aeróbicos, 6) No son capaces de producir porfirinas (Broadbent y Steele, 2005).

Dentro de las bacterias lácticas se incluyen a los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Jay, 2000). Existen diversos géneros de BAL; sin embargo, éstas son agrupadas como homofermentativas o heterofermentativas basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentativas como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Embden-Meyerhof) (Axelsson y Ahrné, 2000). Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentativas y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconatofosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, acetato, etanol y CO<sub>2</sub>.

La leche es el medio típico para el crecimiento y desarrollo de las bacterias lácticas; sin embargo, existen otros medios de crecimiento y producción de metabolitos

de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de los cereales, vegetales y carne. Para que estas bacterias puedan crecer en leche requieren tener un sistema proteolítico que les permita degradar la caseína como su fuente principal de nitrógeno en la leche (Smacchi y Gobbetti, 2000).

#### 2.4.1 Sistema proteolítico de las bacterias lácticas

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas se ha estudiado para la producción de péptidos bioactivos por acción específica del sistema proteolítico, durante la fermentación de leche. El sistema proteolítico más estudiado ha sido el de *Lactococcus lactis*, se ha reportado que puede generar péptidos bioactivos; así como también: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* (Axelsson y Ahrné, 2000).

De acuerdo a la especie, se pueden encontrar diferencias entre el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas, pero es evidente que estas especies necesitan medios ricos en proteína para su crecimiento. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos con muchas auxotrofías y por lo tanto su crecimiento siempre depende de la eficiencia de su sistema para la degradación de las proteínas y del transporte de aminoácidos y péptidos pequeños. Por otra parte, las bacterias lácticas tienen sistemas proteolíticos que son altamente específicos y dan como resultado la producción de péptidos únicos. Las bacterias ácido lácticas que inician la fermentación en la leche, un medio rico en lactosa, hidrolizan principalmente a la caseína- $\alpha$ s1 y a la  $\beta$ -caseína, por ser las proteínas que se encuentran en mayor concentración (Kok y De Vos, 1994).

Las proteinasas ayudan a liberar péptidos derivados de caseína de diferentes tamaños. Estos péptidos son sustratos naturales de peptidasas que después los convierten a péptidos más pequeños y aminoácidos (Figura 2.4). Muchas de estas peptidasas están localizadas en el interior de las células y como consecuencia, el rompimiento proteolítico final se lleva a cabo después del transporte de los péptidos al interior. Pero en general, el sistema consiste en una serie de reacciones en serie que

inician por una serino-proteinasa prolino-específica localizada extracelularmente, transporte específico de di-, tri- y oligopéptidos y reacción de un sin número de peptidasas y aminopeptidasas intracelulares (Kok y De Vos, 1994).

Los componentes estructurales del sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas pueden ser divididos en tres grandes grupos de acuerdo a su función: 1) Proteineras son las encargadas del rompimiento inicial de proteínas, 2) Peptidasas degradan los péptidos formados por la acción de las proteineras y 3) Sistemas de transporte trasladan los péptidos producidos hacia la membrana citoplasmática. Podría parecer que la presencia de peptidasas en el sistema representaría un problema para la recuperación de los péptidos, pero se ha comprobado que en general el sistema de proteineras es extracelular y las peptidasas se encuentran solo dentro de la célula, esto restringe la ruptura de los péptidos a solo aquellos que son introducidos en la célula (Kunji *et al.*, 1996).

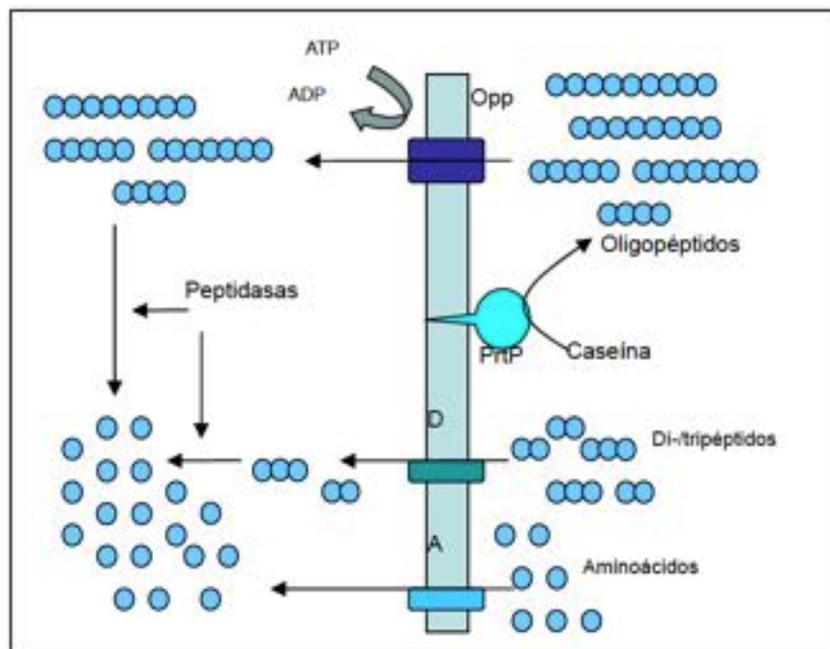


Figura 2.4 Sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*. D) representa el sistema de transporte de dipéptidos y tripéptidos y A) sistema de transporte de aminoácidos.

Rojas-Ronquillo *et al.* (2012)

#### 2.4.1.1 Sistema proteolítico de *Lactobacillus helveticus*

*Lactobacillus helveticus* es una bacteria ácido láctica homofermentativa y muestra tendencias termofílicas con una temperatura de crecimiento óptima de 42 a 45 ° C. El crecimiento de *L. helveticus* es óptimo a un pH de 5.5 a 5.8 y la especie se considera exigente porque tiene requisitos nutricionales complejos de aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos. Es ampliamente utilizada en la fabricación de quesos añejos italianos y suizos y en la producción de bebidas lácteas fermentadas (Gatti *et al.*, 2004; Slattery *et al.*, 2010). Esto ha hecho que *L. helveticus* sea de importancia comercial puesto que promueve la salud en productos alimenticios probióticos y nutracéuticos, además de tener el potencial de producir péptidos bioactivos o bacteriocinas y ejercer un efecto simbiótico cuando se asocia con prebióticos en productos lácteos fermentados (Cremonesi *et al.*, 2013).

*Lactobacillus helveticus* es auxótrofo para varios aminoácidos; por lo que el crecimiento rápido en la leche u otros entornos que contienen bajos niveles de aminoácidos libres dependen de un complejo sistema de enzimas proteolíticas cuya función colectiva implica la obtención de aminoácidos esenciales necesarios para su crecimiento (Christensen y Steele, 2003).

El sistema proteolítico de *L. helveticus* es capaz de producir péptidos pequeños y liberar aminoácidos de la matriz de caseína. Esto se debe a que posee una mayor actividad proteolítica que la mayoría de los otros lactobacilos y por qué hidroliza más caseína en los medios de cultivo que otras especies (Savijoki *et al.*, 2006). Además del *L. lactis*, *L. helveticus* se describe como una de las especies más proteolíticas de las bacterias ácido lácticas, y la presencia de varios genes que constituyen su sistema proteolítico podría explicar su eficacia. Este sistema proteolítico que es capaz de producir péptidos cortos y liberar aminoácidos pues posee proteinasas de la pared celular (CEP) que hidrolizan las proteínas en oligopéptidos, sistemas de transporte que permiten la captación de oligopéptidos y varias peptidasas intracelulares con diferentes

y especificidades, lo que da lugar a un conjunto de aminoácidos libres (Beganović *et al.*, 2013).

Se ha reportado que la cepa de *L. helveticus* DPC4571 posee un potente sistema proteolítico que consta de al menos 24 peptidasas intracelulares (Callanan *et al.*, 2008). También se ha demostrado que la fase de crecimiento y el medio de crecimiento afectan la actividad relativa de estas peptidasas dentro de la célula (Kenny *et al.*, 2003).

La mayoría de las BAL poseen solo una proteinasa en la pared celular, pero se ha demostrado que *L. helveticus* tiene al menos dos: PrtH y PrtH2 (Gilbert *et al.*, 1997). Las proteinasas de la pared celular de las BAL se sintetizan como preproteínas de aproximadamente 2000 residuos y se componen de siete dominios funcionales: S, PP, PR, A, B, H y W (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). PrtH1 y PrtH2 presentes en *L. helveticus* difieren de las proteinasas de la pared celular de otras BAL porque carecen del dominio de anclaje (AN), que se encuentra en el extremo C-terminal de la secuencia de la proteinasa. La presencia de varios genes que codifican el sistema proteolítico de *L. helveticus* podría explicar la alta eficiencia de su sistema proteolítico (Genay *et al.*, 2009).

Los aminoácidos y péptidos se transportan a través de la membrana citoplásmica mediante proteínas de transporte específicas. La segunda etapa de la degradación de proteínas es el transporte de di-, tri- y oligopéptidos al interior de la célula mediante diferentes sistemas de transporte de péptidos. Una de las primeras publicaciones sobre el sistema de transporte de péptidos de *L. helveticus* concluyó que los aminoácidos Leu, Ile, Val, Thr y Lys eran transportados por un sistema de transporte secundario, mientras que los aminoácidos Asp, Glu, His, Arg y Tyr parecían ser transportados por un sistema impulsado por ATP (Nakajima *et al.*, 1998). *L. helveticus* DPC4571 posee tres sistemas de transporte de péptidos, el sistema de transporte de oligopéptidos Opp y el sistema de transporte de di- y tripéptidos Dpp y DtpT, respectivamente. Los estudios de especificidad del sustrato mostraron que DtpT

tiene preferencia por péptidos más hidrófilos. Además, se demostró que el transporte de péptidos a través de DtpT en vesículas de membrana depende de la energía y es impulsado por la fuerza motriz del protón (Nakajima *et al.*, 1998).

Las peptidasas se clasifican generalmente en endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las endopeptidasas son enzimas que rompen enlaces peptídicos internos. Las aminopeptidasas catalizan la liberación de aminoácidos N-terminales y las carboxipeptidasas catalizan la liberación de aminoácidos C-terminales. Las enzimas peptidasas se clasifican según la naturaleza química del grupo responsable de la catálisis (Nakajima *et al.*, 1998).

Se conocían que solo 11 peptidasas formaban parte del sistema proteolítico de *L. helveticus*: dos endopeptidasas específicas de prolina, PepE y PepO; una tripeptidasa PepT; cuatro aminopeptidasas, PepX, PepI, PepQ y PepR; y cuatro dipeptidasas, PepD, PepV, PepC y PepN (Giraffa, 2014). Pero se reportó que la cepa CNRZ32 de *L. helveticus* tiene siete oligoendopeptidasas, tres aminopeptidasas generales, cinco peptidasas específicas de prolina, ocho di o tripeptidasas y al menos otras seis peptidasas (Broadbent *et al.*, 2011). Una endopeptidasa con la capacidad de hidrolizar los péptidos Val-Pro-Pro-Phe-Leu e Ile-Pro-Pro-Leu-Thr para producir Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, respectivamente, fue caracterizada a partir de *L. helveticus* CM4. Con base en los resultados, se sugirió que la enzima es un actor clave en la hidrólisis del C-terminal durante la producción de Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro en leche fermentada (Ueno *et al.*, 2004).

#### 2.4.1.2 Sistema proteolítico de *Lactiplantibacillus plantarum*

*Lactiplantibacillus plantarum* es una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, capaz de crecer a un intervalo de temperaturas de entre 15 y 45 °C y tolerar valores de pH entre 4 y 9. También es heterofermentativa facultativa, aeróbica y anaeróbica facultativa. Forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Producen ácido láctico como el principal producto metabólico de la

fermentación de carbohidratos. Esta bacteria es capaz de producir ácido láctico por fermentación de la glucosa empleando una ruta metabólica denominada Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). La fermentación de las hexosas por esta vía metabólica produce ácidos D- y L-lácticos (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2015).

*L. plantarum* tiene varias aplicaciones en la industria alimentaria. Se ha aislado de diferentes productos alimenticios como carne, pescado, frutas, verduras, productos lácteos y cereales, como contaminante natural, y se ha utilizado como cultivo iniciador en diversos procesos de fermentación de alimentos contribuyendo a las propiedades organolépticas, sabor y textura. Además, *L. plantarum* puede producir compuestos antimicrobianos, contribuyendo a la seguridad del producto final (Todorov y Franco, 2010).

El *L. plantarum* es una especie que se encuentra en muchos nichos ambientales diferentes, y este comportamiento flexible y adaptativo se refleja en el número relativamente grande de funciones reguladoras y de transporte, incluidos 25 sistemas completos de transporte de azúcar PTS (Kleerebezem *et al.*, 2003). Las cepas de *L. plantarum* se utilizan ampliamente como cultivos adjuntos para la maduración acelerada durante la producción de diferentes tipos de quesos. Debido a que las cepas de *L. plantarum* poseen varias proteinasas unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares, dichas enzimas, cuando se liberan en la matriz del queso, pueden influir en la proteólisis (Duan *et al.*, 2019).

*L. plantarum* es un organismo versátil y flexible y puede crecer en una amplia variedad de fuentes de azúcar. Este rasgo fenotípico se refleja en el elevado número de genes que codifican supuestos transportadores de azúcar. El sistema de transporte de *L. plantarum* 5-2 consta de 240 genes, que constituyen principalmente el sistema de fosfotransferasa (PTS) y el sistema transportador de casete de unión a ATP (ABC). Sesenta y siete genes estaban relacionados con el sistema PTS genómico, y codificaban la enzima I (EI) de PTS y a la proteína fosfoportadora HPr, que libera grupos fosforilo del fosfoenol-piruvato a las enzimas EII (EII). Existen diez complejos

PTS EII completos que están involucrados en el transporte de fuentes de carbono, incluidos beta-glucósidos, celobiosa, fructosa, galactitol, glucosa, manitol, manosa, N-acetilgalactosamina, sorbitol y sacarosa. Se sabe que varios sistemas de transporte de azúcar importan más de un sustrato, lo que amplía la capacidad de transporte de carbono (Liu *et al.*, 2015).

La actividad de las proteinasas de la pared celular de *L. plantarum* han sido estudiadas para la obtención de péptidos, como reporta Chen *et al.*, (2018) que demostró que la leche de cabra fermentada por *L. plantarum* LP69 mostró una fuerte actividad inhibidora de la ACE y actividad antioxidante; además de estudiar el sistema proteolítico de *L. plantarum* LP69 encontraron que los hidrolizados de leche de cabra catalizados por proteinasas tienen una fuerte actividad inhibidora de la ACE y actividad antioxidante.

Se ha demostrado también que *L. plantarum* posee las endopeptidasas PepE y PepG y algunas prolina peptidasas como PepI, PepR y PepL dentro de su sistema proteolítico. La presencia estas peptidasas parecen ser esenciales para el crecimiento o supervivencia bacteriana, ya que están presentes en los genomas de otras BAL. El *L. plantarum* posee los tres sistemas de transportes de péptidos conocidos para las BAL, es decir, los sistemas di/tripéptidos Dpp y DtpT y el sistema de oligopéptidos Opp. Posee cuatro enzimas DppA/P en el sistema de transporte de oligopéptidos; y al menos una enzima DppB, DppC, DppD, DppF y DppY en su sistema de transporte de di/tripéptidos. También posee tres familias de peptidasas: PepP, PepQ y PepM, las cuales requieren iones metálicos para su actividad catalítica. PpeM es una metionil aminopeptidasa que escinde sobre la metionina en el extremo N-terminal de las proteínas. PepP es parte de las prolina peptidasas y escinden sobre cualquier aminoácido en el extremo N-terminal unido a la prolina en un oligopéptido. PepQ es también una prolina peptidasa, aunque específica para Dipéptidos Xaa-Pro, donde Xaa representa cualquier aminoácido (Liu *et al.*, 2010).

### 3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, ya que toda fuente de proteínas alimentarias es capaz de aportar péptidos funcionales (Korhonen y Pihlanto, 2006). Los péptidos bioactivos se encuentran dentro de la secuencia de las proteínas y son secuencias específicas en su mayoría de 2 a 10 aminoácidos, que poseen importantes funciones biológicas por lo que su estudio se ha incrementado debido a su implicación en el tratamiento de algunas enfermedades (Moller *et al.*, 2008). La leche y sus derivados son una fuente de biopéptidos, sin embargo, los biopéptidos se encuentran en otras fuentes de origen animal y vegetal como carne, huevos, peces, trigo, maíz, soya, arroz, centeno, amaranto (Gibbs *et al.*, 2004; Silva-Sanchez *et al.*, 2008). Considerando que las proteínas ingeridas a través de la dieta son necesarias para el crecimiento y mantenimiento de las funciones fisiológicas, ha surgido el interés de identificar y caracterizar péptidos bioactivos de origen vegetal. El amaranto posee una alta concentración de proteínas las cuales son consideradas de alto valor nutritivo por contener aminoácidos esenciales como la lisina, triptófano y metionina. Se han evaluado diferentes actividades biológicas de componentes aislados de amaranto demostrando que puede ser una buena fuente de compuestos bioactivos (Terán *et al.*, 2015). Es por ello que el objetivo de esta investigación se centra en la obtención de péptidos liberados mediante la hidrólisis con bacterias ácido lácticas a partir de las fracciones proteicas de la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y la evaluación de posibles actividades biológicas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar la capacidad de bacterias lácticas para liberar péptidos bioactivos a partir de fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus*

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las fracciones de proteína de reserva (albúminas, globulinas, 7S-G, 11S-G y glutelinas) de la semilla de amaranto
- Estandarizar las condiciones de hidrólisis de fracciones proteicas de semilla de amaranto con *Lactobacillus helveticus* y *Lactiplantibacillus plantarum* para evaluar la liberación de péptidos
- Evaluar el efecto de la fase de crecimiento de *Lactobacillus helveticus* y *Lactiplantibacillus plantarum* sobre el desarrollo de proteólisis en fracciones proteicas de amaranto
- Evaluar e identificar la presencia de actividad biológica en los péptidos liberados de las fracciones proteicas
- Determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos con función biológica

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Esquema general de trabajo

El esquema de trabajo describe el proceso de investigación que se llevó a cabo para la identificación de péptidos con actividad biológica, el cual se muestra en la Figura 5.1. La metodología para este trabajo de investigación se dividió en tres etapas. La primera consistió en la caracterización de las fracciones proteicas extraídas de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*. En la segunda se caracterizaron las fracciones obtenidas de la hidrólisis por acción proteolítica de *Lactobacillus helveticus* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Y por último una tercera etapa que tuvo como objetivo purificar e identificar péptidos con actividad biológica.

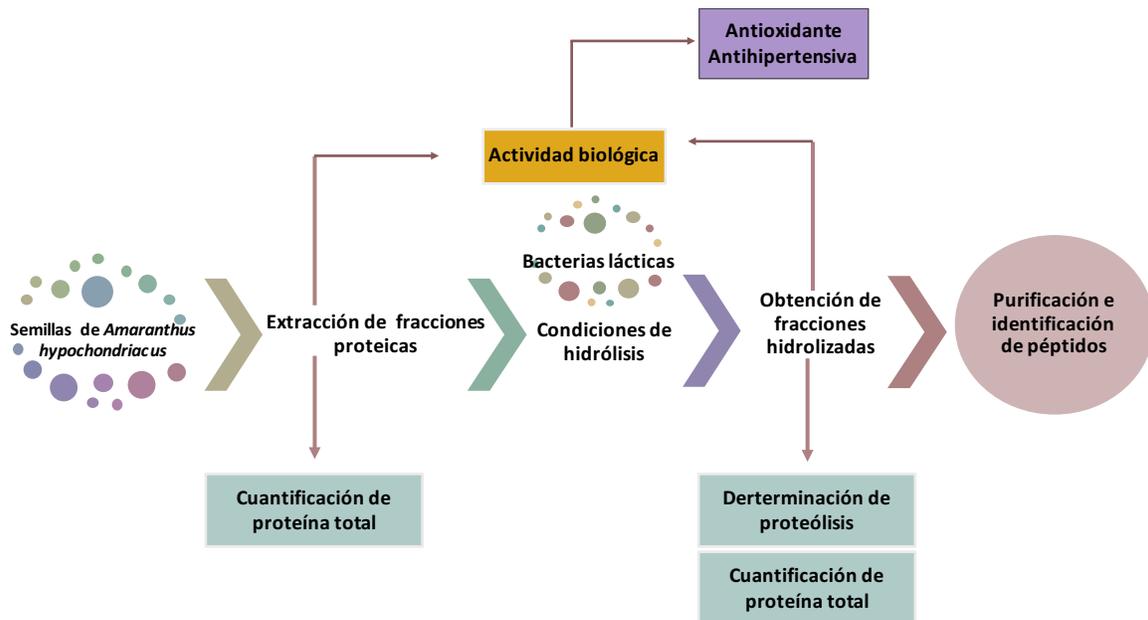


Figura 5.1 Esquema general para la obtención de péptidos

## 5.2 Material biológico

En este trabajo se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* cultivado de forma orgánica en los estados de Puebla, Oaxaca e Hidalgo; adquiridas en la empresa del grupo Quali, en empaques de 250 gramos.

La hidrólisis de las proteínas de amaranto se realizó con bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*: *Lactobacillus helveticus* NRRL-B-4536 y *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL-B-4496 donadas por el Agricultural Research Service-USDA (United States Department of Agriculture). Las cepas se mantuvieron en refrigeración en agar MRS y fueron reactivadas en caldo MRS, incubándolas a 37 °C en condiciones anaerobias.

## 5.3 Obtención de harina de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)

Las semillas se molieron en un molino Pulvex 200 con motor 5 H.P. para obtener harina y se tamizó en una malla No. 80 ( $\leq 0.177$  mm). La harina se desengrasó durante 4 h con hexano a una relación harina:hexano 1:10 (p/v) con agitación magnética a 4 °C. La mezcla se centrifugó (Centrífuga Eppendorf® 5810R Rotor F-34-6-38) a 18,550  $\times g$  por 20 min a 4 °C. El pellet resultante libre de grasa se secó a temperatura ambiente. La harina desengrasada se almacenó a 4 °C hasta su uso.

## 5.4 Extracción de fracciones de proteína de reserva

La extracción de las diferentes fracciones proteicas se llevó a cabo en harina desengrasada de semillas de amaranto. La extracción se realizó de acuerdo con la clasificación de Osborne, (1924), siguiendo el protocolo descrito por Silva-Sanchez *et al.* (2008) con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

La fracción de albúminas más nitrógeno no proteico (NNP) se obtuvo con agua destilada utilizada como agente de extracción. Las suspensiones de harina: solvente (1:10 p/v) se mantuvieron en agitación magnética constante durante 1 h a 4 °C y posteriormente se centrifugaron a 18,000  $\times g$  por 15 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción de albúminas) se colectó y congeló para su análisis posterior. El pellet resultante se resuspendió en una solución que contenía NaCl 0.1 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010 M,

EDTA 0.001 M, pH 7.5. Para la extracción de globulinas 7S, se agitó durante 1 hora a 4°C, se centrifugó a 12000 x g durante 15 min; se realizó una tercera extracción resuspendiendo el pellet en solución Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 8, se agitó durante 1 hora a 4°C y se siguió el procedimiento de extracción antes mencionado, se recuperó la fracción de globulinas en el sobrenadante. La fracción de globulinas 11S se obtuvo resuspendiendo el pellet anterior en el buffer NaCl 0.8 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010 M, EDTA 0.001 M, pH 7.5. Finalmente, las glutelinas se extrajeron con una solución de NaOH 0.1 M siguiendo con el procedimiento ya descrito. Los sobrenadantes se colectaron, liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### 5.5 Determinación de la concentración de proteína en las fracciones

El contenido de proteína de las fracciones se cuantificó por el método de Lowry modificado por (Markwell *et al.*, 1978), todas las muestras se analizaron por triplicado. Para iniciar la reacción, fue necesario preparar una solución A que contenía 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,4% de NaOH, 0,16% de tartrato de sodio y 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) en agua; la solución B se preparó con CuSO<sub>4</sub> al 4% en agua destilada, y una solución C, la cual se preparó justo antes de llevar el procedimiento, mezclando las soluciones A y B en una proporción de 100 a 1. El reactivo 2N Folin-Ciocalteu fue diluido en una relación 1:1 con agua antes de su uso. Para determinar la concentración de la proteína en cada muestra, se realizó una curva estándar con soluciones de albúmina de suero bovino (BSA), a diferentes concentraciones (0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 µg/mL), como se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Concentraciones de BSA para construir curva estándar

Vol. de 0.5%SDS (µL)	200	190	180	160	120	80	40	0
Vol. de 200 µg/mL de BSA (µL)	0	10	20	40	80	120	160	200
Concentración BSA (µg/mL)	0	10	20	40	80	120	160	200

Se transfirieron 200  $\mu$ L de cada concentración estándar o muestra a viales de 1.5 mL, se mezclaron con 600  $\mu$ L de reactivo C y se incubaron a temperatura ambiente durante 25 min. Se agregaron 70  $\mu$ L de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu diluido y se agitaron inmediatamente para evitar la localización del color. Los viales se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min seguido de la lectura de absorbancia a 660 nm usando lector de microplacas BioTek® Epoch™ UVVis, controlado por el software Gen5™. La curva de calibración construida con BSA se utilizó para determinar el contenido de proteína de las muestras.

#### 5.6 Caracterización de las fracciones proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los análisis del perfil electroforético de las proteínas fueron realizados según lo descrito por Laemmli, (1970). Todos los geles fueron al 12 % de poliacrilamida y 0.75 mm de espesor, se corrieron en un sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. La reducción de puentes disulfuro se llevó a cabo con mercaptoetanol a 95 °C durante 5 min. Las condiciones de corrida de electroforesis se realizaron con una corriente constante de 13 mA por gel por 1-2 h. Después de la electroforesis los geles se tiñeron toda la noche con Azul de Coomassie Brillante R-250 en una concentración final de 0.25 %. El desteñido se llevó a cabo lavando el gel con una solución de 50 % metanol + 2 % ácido acético durante 1 h. Los geles fueron fotografiados en un equipo ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad® con el software Image Lab para su análisis posterior. Las muestras fueron disueltas en buffer reductor con dodecil sulfato de sodio (SDS): 62.5 mM Tris-HCl, 20 % de glicerol, 2 % de SDS, 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol, pH 6.8. Este procedimiento se realizó en las fracciones de proteína de reserva previamente liofilizadas.

#### 5.7 Análisis de las fracciones de proteínas de reserva por espectrometría de masas

Se tomaron 1.5 mg de cada fracción de proteína de amaranto liofilizada y se disolvieron en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM y se desnaturalizaron a

110 °C durante 5 min. La hidrólisis de los enlaces disulfuro y la alquilación se realizaron con DTT (5 mM) y yodoacetamida (10 mM), seguida de una hidrólisis con tripsina (Sigma T-1426) como describió previamente (Walters *et al.*, 2018b). Cada muestra de proteína se pasó a través de una membrana de nylon tipo jeringa con tamaño de poro de 0.22 µm seguida de una inyección con un volumen equivalente a 0.4 µg de proteína. El análisis se realizó en un LC/MS iFunnel Q-TOF 6550A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La columna se eluyó con un gradiente lineal de 100% de disolvente A (HCOOH al 0.1% en agua) a 100 % de disolvente B (HCOOH al 0.1% en acetonitrilo) en 30 min. El rango de masas fue de 100-1600 m/z y la tasa de adquisición fue de 8098 transitorios/espectro. La temperatura del gas se estableció a 125 °C, la velocidad del gas de secado en 11 L/min y el nebulizador a 206.84 kPa. Los iones de carga múltiple (2<sup>+</sup> y 3<sup>+</sup>) entre 100 y 1600 m/z se sometieron automáticamente a un análisis MS/MS y los picos resultantes se procesaron utilizando los softwares Mascot Distiller y Mascot 2.4.1 (Matrix Science, Reino Unido). Se utilizó el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificar proteínas que pertenecen a *A. hypochondriacus* en la base de datos de no reductores del NCBI.

#### 5.8 Hidrólisis de las fracciones por actividad proteolítica de las bacterias

Las cepas se reactivaron en 10 mL de caldo MRS, se incubaron por 12 h a 37 °C en condiciones anaerobias. Posteriormente, se hizo una resiembra tomando 1 mL de este tubo y se colocó en un matraz de 50 mL de caldo MRS; este procedimiento se repitió una vez más; del tercer matraz se tomó 1 mL al tiempo cero y después cada 2 horas para medir la densidad óptica por espectrofotometría a 640 nm con la finalidad de identificar las fases de crecimiento. Se evaluó la cuenta viable (unidades formadoras de colonias, UFC/mL) por el método de vaciado en placa.

Una vez identificadas las fases de crecimiento, se inoculó en 50 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C en condiciones anaerobias. Se cosecharon células en la mitad de la fase exponencial, final de la fase exponencial, fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía, por centrifugación a 6000 x g durante 15 min a 4 °C. Las células se lavaron con buffer de fosfato sódico 0.32 mM pH 7.2 y se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración celular de 10<sup>7</sup> UFC/mL; la concentración celular

se estandarizó previamente, se resuspendieron diferentes cantidades de biomasa húmeda en el buffer y se realizó conteo en placa. Se prepararon mezclas en una relación 0.5:5 de suspensión bacteriana y 5 mL de una solución de proteína de reserva con una concentración de 5 mg/mL, se dejó incubar a 37 °C durante 4, 8, 14, 24 y 48 h en condiciones anaerobias (se prepararon dos tubos de mezcla para cada tiempo de incubación). Al tiempo cero y al final de cada tiempo de incubación se tomaron muestras para evaluar la cuenta viable (UFC/mL) por el método de vaciado en placa (100 µL) y el desarrollo de proteólisis (500 µL) . El resto de la mezcla de reacción se centrifugó 9,500 x g durante 5 min y el sobrenadante (hidrolizado) se guardó a -4 °C hasta utilizarse.

#### 5.8.1 Determinación de proteólisis

Una vez pasado el tiempo de incubación, se tomaron 500 µL de la mezcla de reacción, se le adicionó agua y ácido tricloroacético (TCA) 0.75 N en una proporción 5:1:10 y se agitó durante 10 min en un agitador orbital. Las muestras se filtraron con papel Whatman No. 1 y se almacenó el filtrado a -4°C hasta el momento de efectuar las pruebas.

El grado de proteólisis se determinó por la técnica del ácido trinitrobenzeno-sulfónico (TNBS); éste se basa en la reacción del TNBS con los grupos amino libres y péptidos pequeños liberados durante la hidrólisis, en un medio ligeramente alcalino (Freedman y Radda, 1968). El complejo resultante es un cromóforo de color naranja y percibe un máximo de absorbancia a 340 nm (Figura 5.2) (Goodwin y Choi, 1970).

Alícuotas de 125 µL del filtrado en ácido tricloroacético se mezclaron con 2 mL de buffer de fosfatos (0.5 M, pH 8.2) y 2 mL de TNBS al 0.1%. Esta solución se prepara justo antes de llevar a cabo la prueba y se mantiene en la oscuridad. Se agitó cada tubo para homogeneizar la solución. La mezcla se incubó en oscuridad a 50 °C durante 1 h; al término de este tiempo se añadieron 2 mL de HCl 0.1 N a cada tubo para detener la reacción. Las mezclas se dejaron enfriar durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se leyó a una longitud de onda de 340 nm contra el blanco de reactivos. Para el blanco, en lugar de muestra se agregó agua desionizada. Se elaboró

una curva patrón utilizando una solución de Glicina 3 mM y posteriormente se hicieron diluciones de ésta para cada uno de los puntos de la curva (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mg/mL). Los resultados se expresan en porcentaje de grupos amino libres.

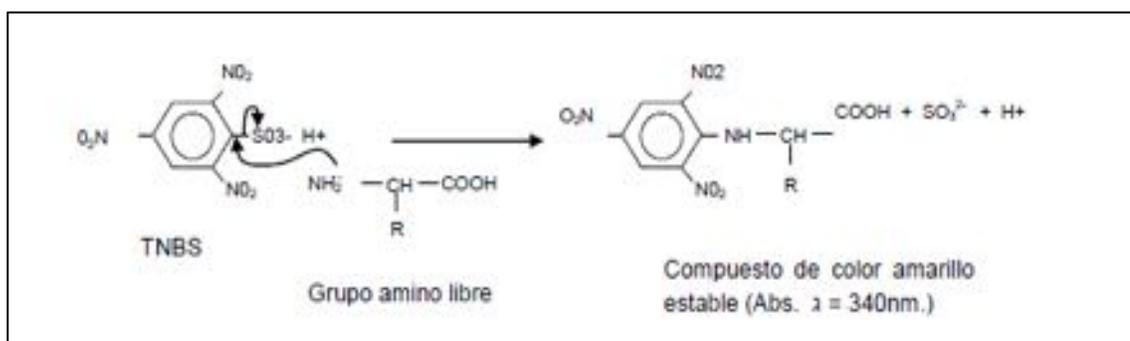


Figura 5.2 Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa.

(Adler-Nissen, 1979)

## 5.9 Determinación de las actividades biológicas

Basados en las propiedades estructurales, en la composición y secuencia de sus aminoácidos, los péptidos bioactivos pueden desempeñar diversas funciones, tales como antihipertensivos, anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobianos, inmunomoduladores, opiáceos, etc. (Korhonen y Pihlanto, 2006). Las actividades biológicas que se determinaron en este trabajo fueron actividad antihipertensiva, antioxidante y capacidad de quelación de zinc.

Todas las actividades biológicas se evaluaron en las fracciones proteicas de reserva sin hidrolizar, en fracciones hidrolizadas con BAL y fracciones hidrolizadas con BAL ultrafiltradas.

### 5.9.1 Determinación de la actividad antihipertensiva

Se determinó la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) siguiendo el método establecido por Cushman y Cheung, (1971). La reacción se llevó a cabo como reporta Fuglsang *et al.*, (2003); el ácido hipúrico resultante de la reacción se determinó por el método de Hayakari *et al.*, (1978). Se tomaron 80 µL de

las muestras y se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de borato 0.1 M, pH 8.3, con el sustrato hipurilhistidil-leucina (HHL) con una concentración 5 mM. Después se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de 0.123 ng/mL de ACE (estándar de proteína ACE de ratón, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y NaCl a 0.4 M, pH 8.3. Los tubos de reacción se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la reacción se detuvo, agregando 250  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 1 N, y se agitó en vortex. El ácido hipúrico, producto de la reacción, fue extraído con 1.7 mL de acetato de etilo. Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica y se calentó 30 min a 95 °C, para evaporar todo el acetato de etilo. El residuo fue resuspendido en 2 mL de agua destilada (fueron resuspendidos justo antes de leer). Se leyó la absorbancia a 230 nm de longitud de onda en espectrofotómetro Stat Fax Mod. 303 Plus. Se usó captopril como testigo a una concentración de 1mg/mL.

El testigo con 0 % de actividad se midió sustituyendo los 20  $\mu\text{L}$  de ACE por agua destilada, y el 100 % de actividad sustituyendo la muestra (inhibidor) por 80  $\mu\text{L}$  de amortiguador de borato 0.1 M, pH 8.3 con sustrato. El porcentaje de inhibición se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{B - A}{B - C} \times 100$$

donde: A es la absorbancia de la reacción con ACE, sustrato e inhibidor (muestra); B es la absorbancia de la reacción con ACE y sustrato (100% de actividad); C es la absorbancia de la prueba con sustrato sin ACE ni inhibidor (0% de actividad). Los resultados se presentan como inhibición específica, que se define como el cociente del porcentaje de inhibición.

#### 5.9.2 Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizaron dos ensayos que midieron la actividad de dos especies de radicales para determinar la capacidad antioxidante de las fracciones de proteína.

#### 5.9.2.1 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC)

Para evaluar la capacidad de las muestras para eliminar radicales ROO• (peroxilo) se midió la capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) de acuerdo con lo reportado por Jodayree *et al.*, (2012). Esta prueba mide hasta qué punto la muestra antioxidante protege a la fluoresceína de la oxidación por ROO•. Se utilizó una solución tampón de fosfato de potasio (75 mM, pH 7.4) para diluir las muestras (1 mg de proteína/mL) y para preparar la sonda fluorescente (fluoresceína,  $8.2 \times 10^{-2}$   $\mu$ M), AAPH (140 mM) y estándares Trolox (6.25–100  $\mu$ M). Se usó como testigo glutatión (0.1 mg/mL). Las muestras y los estándares se colocaron en una placa con pozos (200  $\mu$ L) y se selló con una película transparente, la cual se incubó durante 20 min a 37 °C en un lector de fluorescencia modelo FLx800 (longitud de onda de excitación 485/20 nm, longitud de onda de emisión 528/20 nm). La cinética se llevó a cabo durante 1 h tomando lectura cada 1 min. La actividad de eliminación de ROO• fue reportada como valores de ORAC, para lo cual se calculó usando el área bajo la curva y expresada en equivalentes de Trolox por gramo de proteína ( $\mu$ M TE/ g de proteína).

#### 5.9.2.2 Capacidad de captación de radicales hidroxilo (•OH)

La prueba se realizó de acuerdo con lo reportado por Vanvi y Tsopmo (2016). Se utilizó una solución tampón de fosfato de potasio (0.75 mM, pH 7.4) para preparar 1,10-fenantrolina a una concentración de 3 mM. Se prepararon soluciones de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O con una concentración de 3 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03%. Se tomaron 50  $\mu$ L de muestra a una concentración (1 mg/mL) y se transfirieron por triplicado a una placa transparente de 96 pocillos. Se usaron 50  $\mu$ L de solución tampón de fosfato de potasio en los pocillos para el testigo y el blanco. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu$ L de fenantrolina a cada pocillo seguido de la adición de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al testigo y las muestras. En los pocillos del blanco, se añadió agua en lugar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La placa se selló con una película de plástico transparente y se incubó durante 1 h a 37 °C y se mantuvo en agitación a 150 rpm. Se midió la absorbancia a 536 nm para calcular la actividad de barrido de HO• utilizando la siguiente ecuación:  $[(A_s - A_{\text{testigo}}) / (A_0 - A_{\text{testigo}}) \times 100]$ . Donde: A<sub>s</sub>: absorbancia de la muestra; A<sub>c</sub>: absorbancia del testigo; A<sub>0</sub>: absorbancia del blanco.

### 5.9.3 Capacidad de quelación de Zinc

Se evaluó la capacidad quelante de zinc como se describe de acuerdo a lo reportado por Udechukwu *et al.*, (2017). El principio de esta prueba se basa en la reacción del 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) con iones de zinc para formar un complejo coordinado de color rojo. Las muestras (1 mg/mL) y el PAR 2 mM se prepararon usando una solución buffer de HEPES-KOH 40 mM (pH 7.5). Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron 250  $\mu$ L de muestra con 125  $\mu$ L de ditioneitol (DTT) 8 mM y 125  $\mu$ L de sulfato de zinc heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 25 mM. Para el blanco, las muestras se sustituyeron por 250  $\mu$ L de buffer de reacción (HEPES-KOH 40 mM). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 10 min. A continuación, se añadieron 25  $\mu$ L de 2 mM PAR a las mezclas de reacción para unir el ion zinc; se tomaron 200  $\mu$ L de cada muestra y se colocaron en una placa con pozos; seguido de la medición de la absorbancia a 500 nm en un lector de placas BioTek® Epoch™ UVVis, con un software Gen5™. La capacidad quelante del zinc se calculó como:  $[(ABS_{blanco} - ABS_{muestra}) / ABS_{blanco}] \times 100$ , donde ABS es la absorbancia.

### 5.10 Ultrafiltración por membranas

Las muestras hidrolizadas de las fracciones de Glutelinas y 11S-G hidrolizadas con *L. plantarum* que presentaron un mayor grado de hidrólisis, se seleccionaron para obtener fracciones ultrafiltradas utilizando dispositivos centrífugos Macrosep® Advance con material de membrana de polipropileno (Pall Life Sciences, Michigan, EE.UU.) con un corte de peso molecular de 10, 3 y 1 kDa. Se utilizó un proceso de ultrafiltración de tres pasos para obtener cinco fracciones de cada muestra hidrolizada. Para el primer paso, se fraccionaron 10 mL de muestra a través de una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa y se centrifugó a 3000 x g durante 30 min (Centrífuga Thermo-Fisher Scientific Sorvall Legend XTR). Se tomó un volumen del filtrado de 2 mL para identificarlo como fracción <10 kDa. Luego se separaron 8 mL de esa muestra filtrada y se completó con 2 mL de agua destilada para igual el volumen inicial (10 mL), y se depositó en una membrana con corte de <3 kDa a 3,000 x g durante 30 min. La fracción retenida se etiquetó como fracción <10-3 kDa y el filtrado como fracción <3 kDa. Se volvió a ajustar un volumen de 10 mL con agua destilada y se depositó en un

tubo de membrana con corte de peso molecular de <1 kDa y se centrifugó en las mismas condiciones. Lo retenido de la muestra se etiquetó como fracción <3-1 kDa y la muestra filtrada como fracción <1 kDa. Se obtuvieron cinco fracciones en total de diferente corte de peso molecular <10, 10-3, <3, 3-1, <1 kDa y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

#### 5.11 Identificación de secuencias de aminoácidos en los péptidos obtenidos por hidrolisis con BAL

El análisis para la identificación de péptidos por LC-MS/MS es muy complejo, ya que cada proteína se hidroliza en más de un péptido, y cada ion fragmentado produce iones con carga múltiple. Los patrones de fragmentación varían con la energía de disociación inducida por colisión utilizada, y las reacciones de los iones precursores de interés aumentan la posibilidad de detección de péptidos. La espectrometría de masas de alta resolución se puede utilizar para secuenciar péptidos e identificar nuevas proteínas. Generalmente, los espectros de masas en tándem se comparan contra una base de datos con valores de masa generados por péptidos fragmentados *in silico* para la identificación de péptidos utilizando motores de búsqueda: MASCOT, SEQUEST, XiTandem e InSpeCT. Estos motores de búsqueda están vinculados a varias bases de datos como GenBank en NCBI, SWISSPROT, UNIPROT, PPDB y ProMEX, que pueden conducir a la identificación de genes correspondientes.

##### 5.11.1 Análisis por espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas en tándem se realizó utilizando la Plataforma de Proteómica de Quebec disponible en el Centro de Genómica de Quebec (Sainte-Foy, QC, Canadá). Los experimentos se realizaron nLC-MS/MS Agilent (nanoLC) acoplada a un espectrómetro de masas tripleTOF 5600 plus (AB Sciex) equipado con una fuente de iones nanoelectrospray en modo positivo. Los péptidos se separaron en un PicoFrit de 15 µm, BioBasicC18, con una columna de 10 cm x 75 µm (New Objective). Las fases móviles fueron ácido fórmico al 0.1% en agua (disolvente A) y ácido acético al 0.1% en acetonitrilo (disolvente B). Para la separación se utilizó un gradiente lineal del 5 al 80% de disolvente B a 60 min, a 300 nL/min. El barrido de

cada espectro de masas (400 a 1250 m/z) fue seguido por una disociación inducida por colisión (MS/MS) de múltiples picos cargados (2<sup>+</sup> a 5<sup>+</sup>). La exclusión dinámica se estableció para un período de 3 segundos y una tolerancia de 0.1 Da.

#### 5.11.2 Identificación de péptidos

Los espectros generados por el análisis MS/MS se analizaron con el programa Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versión 2.5.1). Mascot se configuró para buscar en la base de datos TAX\_Amaranthus\_3564\_20200402 asumiendo que la enzima de digestión no era específica. Mascot se configuró con una tolerancia de masa de iones fragmentados de 0.60 Da y una tolerancia de iones parentales de 10.0 PPM. La desamidación de asparagina y glutamina y la oxidación de metionina se especificaron en Mascot como modificaciones variables. Se utilizó el programa Scaffold (versión Scaffold\_4.11.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en MS/MS. Las identificaciones de péptidos se aceptaron si podían establecerse con una probabilidad superior al 95 % mediante el algoritmo Peptide Prophet (Keller *et al.*, 2002). Se aceptaron las identificaciones de proteínas a las cuales pertenecían los péptidos si podían establecerse con una probabilidad del 95 % y si contenían al menos 2 péptidos identificados y se asignaron usando el algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Las proteínas que mostraron péptidos similares y no pudieron diferenciarse basándose únicamente en el análisis de MS/MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia.

#### 5.12 Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD) de los triplicados. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba F de Fisher y una  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización de las fracciones proteicas de reserva de *A. hypochondriacus*

En este trabajo se utilizó harina desengrasada de la semilla de amaranto como material para la extracción de las proteínas de reserva: albúminas, globulinas, globulinas 7S (7S-G), globulinas 11S (11S-G) y glutelinas. No se consideró la extracción de la fracción de prolaminas, ya que dicha fracción es la que se encuentra en menor proporción en la semilla de amaranto (Segura-Nieto *et al.*, 1992). Existen diferentes investigaciones que debaten sobre cuál de estas fracciones es el componente principal, pero siempre se ha encontrado una mayor proporción de albúminas, globulinas y glutelinas (Bressani y Garcia-Vela, 1990).

Las proteínas de reserva constituyen la mayor proporción de proteínas en semillas de cereales cuya función principal es proveer a la plántula de nitrógeno y azufre para su germinación. Las proteínas de reserva representan alrededor del 50% total de las proteínas en granos de cereales. La Figura 6.1 muestra el porcentaje obtenido para cada fracción de proteína de reserva a partir de 100 g de harina desengrasada. La fracción de albúminas y glutelinas comparten valores de 30 y 32 % respectivamente, mostrando que son las fracciones en mayor proporción encontradas en semillas de amaranto. Segura-Nieto *et al.*, (1994) reportaron que la relación albúminas:globulinas depende del método de extracción empleado. Por ejemplo, con precipitación isoeléctrica se han identificado globulinas pero no albúminas, mientras que con diálisis la fracción de albúminas se ha logrado caracterizar (Fidantsi y Doxastakis, 2001). El método de extracción que se usó en este trabajo fue eficiente puesto que se lograron caracterizar las principales proteínas de reserva del *A. hypochondriacus*.

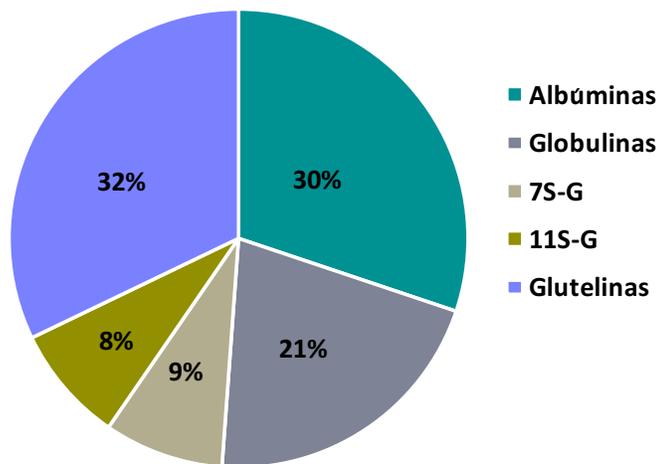


Figura 6.1 Porcentaje obtenido para cada fracción de proteínas de reserva a partir de harina de amaranto desengrasada.

Con la finalidad de realizar una solución de cada fracción de proteína de reserva con una concentración conocida (5 mg/mL) para llevar a cabo el desarrollo de proteólisis, fue necesario conocer el contenido de proteína por mg de liofilizado de cada fracción. La fracción de glutelinas mostró un contenido de  $959.9 \pm 23.5$   $\mu\text{g}$  proteína/mg liofilizado; mientras que en la fracción de albúminas se obtuvo  $900.6 \pm 6.2$   $\mu\text{g}$ . proteína/mg liofilizado. Las fracciones 7S-G y 11S-G tuvieron la menor cantidad, ambas con 250  $\mu\text{g}$  proteína/mg liofilizado.

Maldonado-Cervantes *et al.*, 2014 realizaron un análisis proteico de la semilla de amaranto de las variedades *A. hypochondriacus*. Sus resultados demostraron que en los cultivos analizados las fracciones en mayor abundancia son albúminas y globulinas; pero también reporta que como tercera fracción predominante se encuentran las globulinas 7S-G. Esto sugiere que la composición de los solventes de extracción, así como su concentración tiene influencia sobre la precipitación de las proteínas dando como resultado propiedades fisicoquímicas diferentes tal como reporta (Abugoch James, 2006).

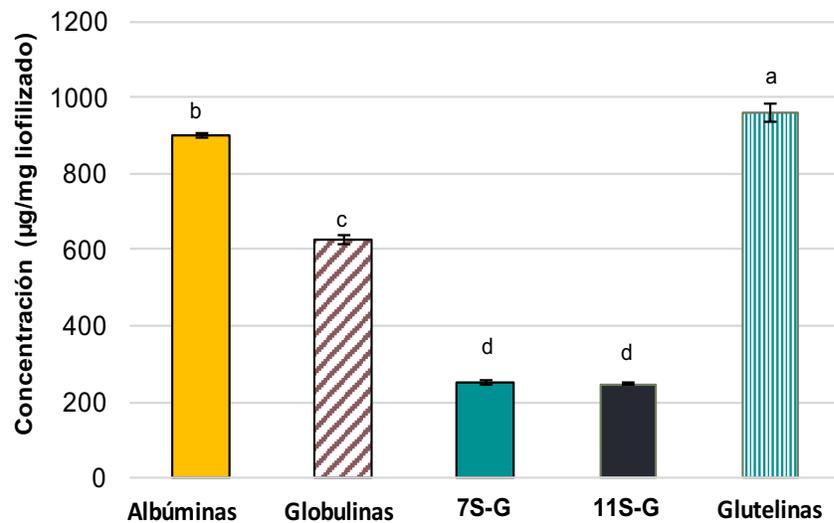


Figura 6.2 Contenido de proteína en los liofilizados de las fracciones de proteínas de reserva de *A. hypochondriacus*.

#### 6.1.1 Caracterización por electroforesis

El análisis electroforético fue llevado a cabo bajo condiciones desnaturizantes. En la Figura 6.3 se muestran las bandas que corresponden a las albúminas, globulinas y glutelinas, mostrando patrones similares. La fracción de albúminas mostró una banda característica a 34 kDa tal como reporta Barba de la Rosa *et al.*, (1992) para *A. hypochondriacus*. Existen dos grupos principales de polipéptidos de tamaños muy heterogéneos; el primero tuvo pesos moleculares de 18 a 14 kDa y el segundo se encontró entre 42 a 25 kDa; se pueden observar componentes de bajo peso molecular en las regiones de 24 y 20 kDa, tal como lo reportó (Akin *et al.*, 2013). La fracción albúminas puede contener proteínas que pertenecen a la fracción globulinas, puesto que las sales y algunos aminoácidos libres en la semilla dan como resultado una concentración de sales naturales que facilitan la solubilización de globulinas. Las fracciones de globulina presentan bandas de 47, 31 y de 28 a 14 kDa, lo cual coincide con Gorinstein *et al.*, (1991) quienes reportan bandas de globulina importantes de 18 a 14 kDa en algunas especies de amaranto, mientras que Barba de la Rosa *et al.*, (1992) reportan que las globulinas mostraron una banda principal a 38 kDa. Las globulinas 7S están compuestas por tres subunidades principales llamadas  $\alpha$  (68 a 57

kDa),  $\alpha'$  (72 a 57 kDa), y  $\beta$  (52 a 42 kDa); que están unidas por enlaces no covalentes para formar un trímero de peso molecular de 200 a 170 kDa. En el gel se pueden observar bandas de 19 a 14 kDa, 37 a 28 kDa y 87 a 47 kDa, siendo 41, 37, 34 kDa las de mayor intensidad. La fracción globulinas 11S están conformadas por hexámeros con un peso molecular entre 400 a 300 kDa. Estos hexámeros están compuestos por polipéptidos ácidos con pesos moleculares de 40 a 30 kDa, y polipéptidos básicos de 22 a 18 kDa (Barba de la Rosa *et al.* 1992). Las bandas de 38, 37, 35 kDa son las que se muestran en el gel con mayor intensidad en esta fracción. La fracción de glutelinas mostró una alta similitud con la de globulinas 11S. Se observaron tres bandas principales a 46, 36, 34 kDa. Las glutelinas son un grupo de proteínas tipo globulinas que tienen una estructura hexamérica oligomérica de aproximadamente 300 kDa. Las fracciones de glutelinas de amaranto presentan tres subunidades principales en la región de 21 a 14 kDa, de 37 a 31 kDa y de 67 a 44 kDa (Silva-Sanchez *et al.*, 2008). Gorinstein *et al.*, (1991) indican que los componentes abundantes en la fracción de glutelinas se encuentran entre, 66 kDa y 65, 30 kDa, 14 y 4 kDa. La caracterización de las fracciones por SDS-PAGE mostró una banda predominante de aproximadamente 34 kDa en todas las fracciones, aunque fue más intensa en la fracción de albúminas.

Además del perfil electroforético, se utilizó espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para identificar las principales proteínas presentes en cada una de las cinco fracciones de proteína de amaranto.

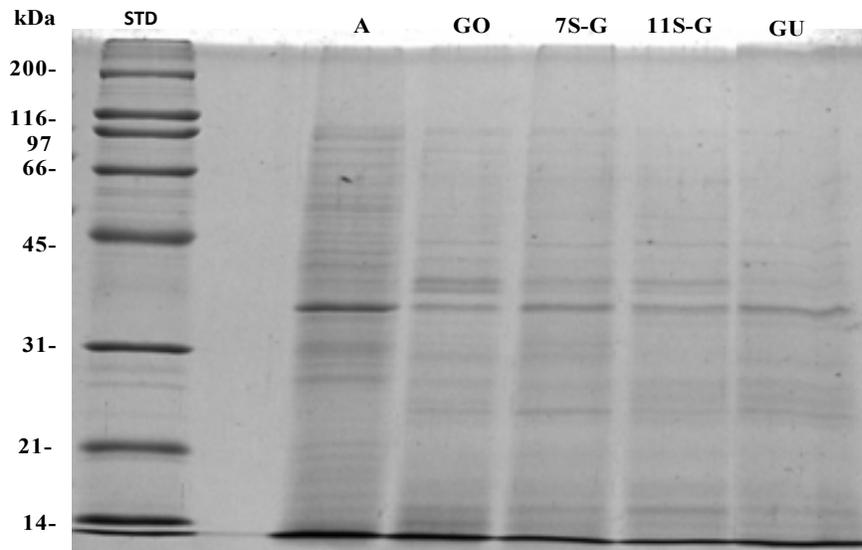


Figura 6.3. SDS PAGE de las fracciones de proteínas de reserva de *Amaranthus hypochondriacus*. Estándar (STD), (A) fracción albúminas, (GO) fracción globulina, (7S-G) fracción globulinas 7S, (11S-G) fracción globulinas 11S y (GU) fracción glutelinas.

#### 6.1.2 Caracterización por espectrometría de masas

Las proteínas principales presentes en las fracciones proteicas de reserva (Tabla 6.1) se identificaron después de la búsqueda de su secuencia en bases de datos como: Swiss Protein Data Bank, Protein Data Bank y GENBank. Las proteínas identificadas fueron Globulina 11S, inhibidor de tripsina, aglutinina, proteína de semilla AmA1 y cistatina. La aglutinina y la proteína de semilla AmA1 estuvieron presentes en todas las fracciones, mientras que la cistatina solo se encontró en la fracción de albúmina. La ausencia de la proteína Globulina 11S en la fracción de albúmina demostró la eficacia del proceso de extracción. En cada fracción se identificaron únicamente 4-5 proteínas principales después del análisis LC-MS/MS. Esto se debe al número limitado de proteínas (quince) del grano de amaranto presentes en las bases de datos (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015) mientras que para la abundancia relativa de proteínas solo se detectan aquellas con mayor cantidad. En general, los datos generados por la espectrometría de masas mostraron que las fracciones contienen diferentes proteínas, por lo tanto, es de esperar que sus hidrolizados muestren

diferentes actividades biológicas. Esto fue respaldado por los datos generados previamente de la digestión *in silico* que sugieren que la mayoría de las proteínas identificadas en *Amaranthus hypochondriacus* podrían contener péptidos con actividades biológicas (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015).

Tabla 6.1 Principales proteínas identificadas en las fracciones de proteínas de reserva de *Amaranthus hypochondriacus*.

NCBI nr i.d <sup>a</sup>	PM (Da)	Proteína	Score <sup>d</sup>	Fracción
gi 4929263 gi 20067185	35221	Aglutinina AmA1	446	<b>Albúmina</b>
gi 110748606	27776	Cistatina	96	
gi 461598	7998	Inhibidor de tripsina/subtilisina	109	<b>Globulinas</b>
gi 122726601	55430	Globulina 11S	558	
gi 4929263 <sup>b</sup> gi 20067185 <sup>c</sup>	35221	Aglutinina AmA1	165	
gi 461598	7998	Inhibidor de tripsina/subtilisina	112	<b>7S-G</b>
gi 122726601	55430	Globulina 11S	433	
gi 461598	7998	Inhibidor de tripsina/subtilisina	116	<b>11S-G</b>
gi 4929263 <sup>b</sup> gi 20067185 <sup>c</sup>	35221	Aglutinina AmA1	86	
gi 122726601	55430	Globulina 11S	535	
gi 461598	7998	Inhibidor de tripsina/subtilisina	86	<b>Glutelinas</b>
gi 4929263 <sup>b</sup> gi 20067185 <sup>c</sup>	35221	Aglutinina AmA1	72	
gi 122726601	57035	Globulina 11S	293	
gi 4929263 <sup>b</sup> gi 20067185 <sup>c</sup>	35221	Aglutinina AmA1	166	

<sup>a</sup> Base de datos NCBI nr. <sup>b</sup> Secuencia prevista <sup>c</sup> Set match de mismos péptidos <sup>d</sup> Score de MS-BLAST.

## 6.2 Estandarización de las condiciones de hidrólisis para evaluar la liberación de péptidos a partir de fracciones proteicas de *A. hypochondriacus* por *Lactobacillus helveticus* y *Lactiplantibacillus plantarum*

Para conocer el porcentaje de grupos amino liberados durante la hidrólisis sobre cada una de las fracciones de proteína de *A. hypochondriacus* fue necesario primeramente identificar las fases de crecimiento de cada lactobacilo. Una vez identificadas, se establecieron 4 tiempos de cosecha celular diferentes y se llevaron a cabo hidrólisis con células a cada tiempo de colecta sobre cada fracción de proteína.

### 6.2.1 Caracterización de crecimiento celular de *Lactobacillus helveticus* y *Lactiplantibacillus plantarum*

La fase de crecimiento durante la cual las bacterias se cosechan y se consumen pueden influir en su desempeño como agentes promotores de la salud. Los cambios más importantes durante el crecimiento ocurren durante la fase exponencial a la fase estacionaria, donde las bacterias pueden presentar un metabolismo flexible, donde se adaptan en cada etapa del crecimiento bacteriano (Laakso *et al.*, 2011). Las características de una población microbiana pueden representarse gráficamente mediante la cuenta del número de colonias o midiendo la densidad óptica por espectrofotometría a partir de una suspensión de células (Ray *et al.*, 2010).

La Figura 6.4 muestra las curvas de crecimiento de *L. plantarum* y *L. helveticus* donde se observan las diferentes fases de crecimiento. La fase de adaptación es donde las células asimilan nutrientes, hay un aumento de masa celular y densidad óptica. Para ambas bacterias se observó un comportamiento similar, donde esta primera fase se presentó a las 2 h. En la fase exponencial, donde el número de células viables comienza a incrementar; las células tienen al principio un índice metabólico diferente y solo algunas células se multiplican y tiempo después lo hacen casi todas. La velocidad de crecimiento aumenta considerablemente. Se puede considerar que a las 4 h los cultivos de ambas bacterias se encuentran aproximadamente a la mitad de la fase exponencial y que a las 8 h se encuentran aproximadamente al final de la fase exponencial.

Por otra parte, la fase estacionaria donde el crecimiento bacteriano disminuye a consecuencia de la falta de nutrientes y a la acumulación de sustancias tóxicas en el medio. Se consideró que a las 14 h los cultivos se encontraban en fase estacionaria temprana y se estableció un tiempo de 24 h como fase estacionaria tardía, la tasa de crecimiento en esta fase es igual a la tasa de mortalidad. Una vez que se identificaron las fases de crecimiento, se propuso cosechar células bacterianas tanto de *L. plantarum* como de *L. helveticus* en los tiempos de cultivo siguientes: 4, 8, 14 y 24 h. Una vez recolectadas las células se lavaron con buffer de fosfatos 0.32 mM, pH 7.2 y fueron resuspendidas en el mismo buffer de fosfatos a una concentración de  $10^7$  UFC/mL para poner en contacto esta suspensión bacteriana con soluciones de las diferentes fracciones de proteína de reserva.

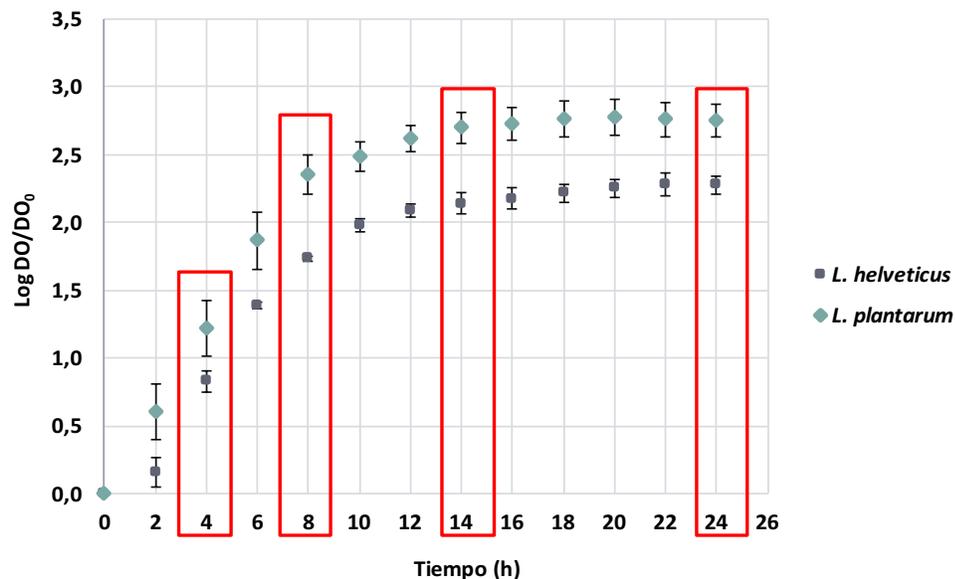


Figura 6.4. Identificación de fases de crecimiento bacteriano con *L. plantarum* y *L. helveticus* en medio MRS por densidad óptica a 37 °C bajo condiciones anaerobias. Los datos presentados corresponden a la media de tres repeticiones experimentales.

### 6.2.2 Hidrólisis de las fracciones por actividad proteolítica de las bacterias

Cada una de las fracciones proteicas extraídas fueron sometidas a cinco tiempos de hidrólisis con células bacterianas cosechadas a cuatro tiempos de crecimiento diferentes.

Las células cosechadas con 4, 8, 14 y 24 h de crecimiento y resuspendidas ( $10^7$  UFC/mL) en buffer de fosfatos 0.32 mM, pH 7.2 se pusieron en contacto con soluciones de fracciones de proteínas a una concentración de 5 mg/mL en una relación 0.1mL:1mL. Se dejó incubar a 37 °C durante 4, 8, 14, 24 y 48 h en condiciones anaerobias. A cada tiempo de incubación se obtuvieron muestras para determinar el grado de proteólisis, a través de la cuantificación de grupos amino liberados, por el método de TNBS.

De manera general se observa en las Figuras 6.5 a 6.9 que el grado de proteólisis varía de acuerdo con la etapa de colecta celular de las bacterias y el tiempo de hidrólisis, lo que podría indicar que existe una degradación de las proteínas por la acción del sistema proteolítico de *L. plantarum* y *L. helveticus*.

En la Figura 6.5 se muestra el porcentaje de grupos amino libres generados después de 4 h de hidrólisis de las fracciones proteicas de reserva de *A. hypochondriacus* con células de *L. plantarum* y *L. helveticus* colectadas a diferentes etapas de crecimiento celular.

En la Figura 6.5a se observa un mayor grado de proteólisis en la fracción de albúminas con células bacterianas de *L. plantarum* colectadas a 4, 8 y 14 h. Mientras que para el resto de las fracciones proteicas con los mismos tiempos de colecta celular se observó una disminución de proteólisis. La disminución de la concentración de grupos amino libres puede deberse a que existe un consumo de péptidos mayor a los generados por parte del microorganismo, ya que estas células se encontraban todavía en fase de crecimiento exponencial cuando se cosecharon y por lo tanto los péptidos son requeridos para la obtención de aminoácidos esenciales para su crecimiento. En la Figura 6.5b se observa una mayor capacidad de proteólisis de *L. helveticus* sobre las fracciones proteicas habiendo una mayor liberación de grupos amino. Con células

colectadas a 24 h existe una disminución en la actividad proteolítica de esta bacteria en contacto con las diferentes soluciones de proteína. La disminución en la actividad proteolítica de la cepa puede deberse a la regulación del sistema proteolítico por la concentración de algunos aminoácidos que se encuentren disponibles en el sustrato (principalmente Ile, Leu y Val) (Donkor *et al.*, 2007). Al mismo tiempo se ha observado que la actividad enzimática de las bacterias no se detiene debido a lisis celular manteniendo así la acumulación de péptidos de distintos pesos moleculares (Gilbert *et al.*, 1997).

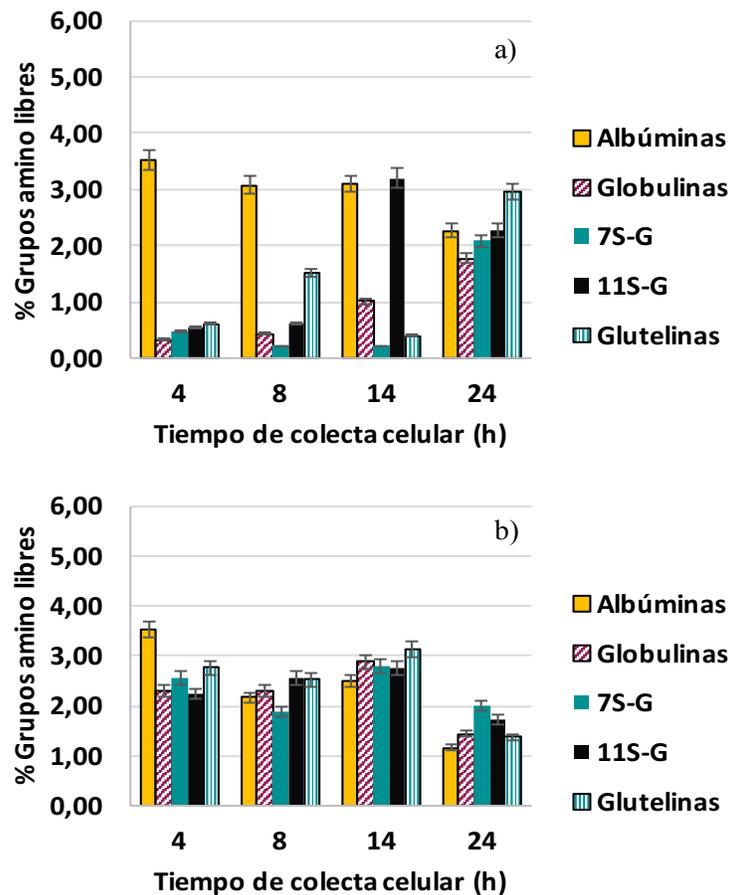


Figura 6.5 Contenido de grupos amino libres después de 4 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) *L. helveticus* y b) *L. plantarum* en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).

En la Figura 6.6, se presenta el contenido de grupos amino libres después de 8 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva con células de *L. helveticus* y *L. plantarum*. Para el caso de las albúminas, el mayor porcentaje de grupos amino libres se observó durante la hidrólisis con células recolectadas a 4, 8, 14 h con *L. plantarum* y con *L. helveticus*. Se notó un incremento el contenido de grupos amino en el resto de las fracciones con células de *L. helveticus* colectadas a 24 h (Figura 6.6a). La concentración de grupos amino libres fue mayor durante la hidrólisis con células de *L. plantarum* colectadas a 4, 8, y 14 h de cultivo (Figura 6.6b). Esto podría indicar que las enzimas que componen el sistema proteolítico de *L. plantarum* presentan una mejor adaptación al sustrato y mantiene así su actividad proteolítica. Las proteasas microbianas juegan un papel importante en la degradación de proteínas en pequeños péptidos y en la posterior degradación en aminoácidos (Fernández *et al.*, 2016).

Sin embargo, con células cosechadas a 24 h existe un menor grado de proteólisis. Esto tal vez se debe a que las enzimas que conforman el sistema proteolítico de *L. plantarum* en fase estacionaria tardía ya no son tan eficientes y por lo tanto solo reservan los aminoácidos necesarios para mantener a las células viables en el sustrato.

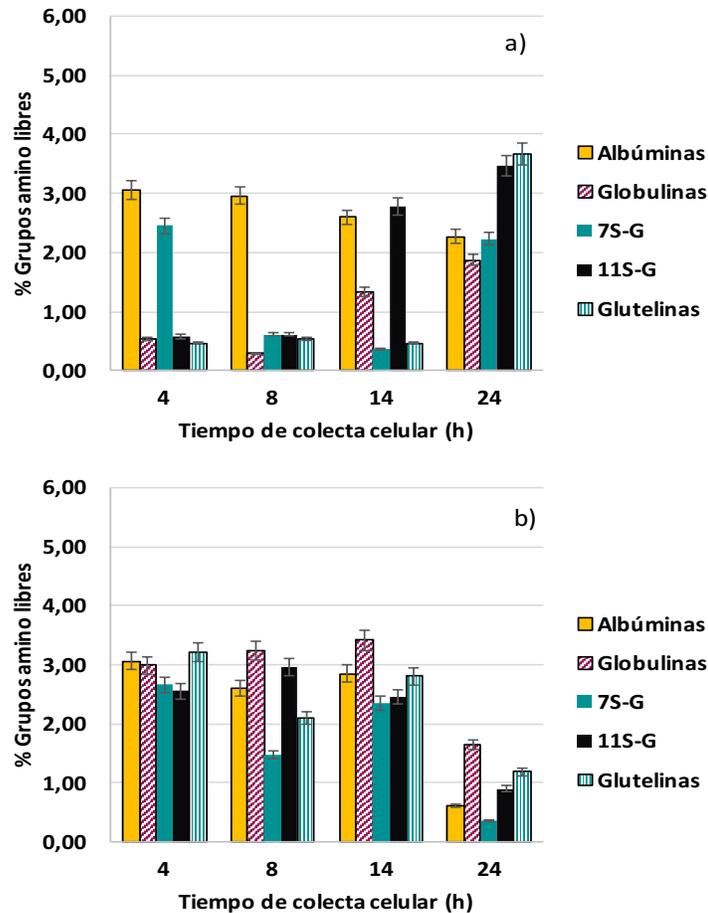


Figura 6.6 Contenido de grupos amino libres después de 8 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) *L. helveticus* y b) *L. plantarum* en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes ( $n = 4$ ).

En la Figura 6.7 se presenta el contenido de grupos amino liberados a un tiempo de 14 h de hidrólisis. En general, *L. plantarum* (Figura 67b) mostró una mayor actividad proteolítica que *L. helveticus* (Figura 67a) para todas las fracciones de proteína con células colectadas 4, 8, 14 h.

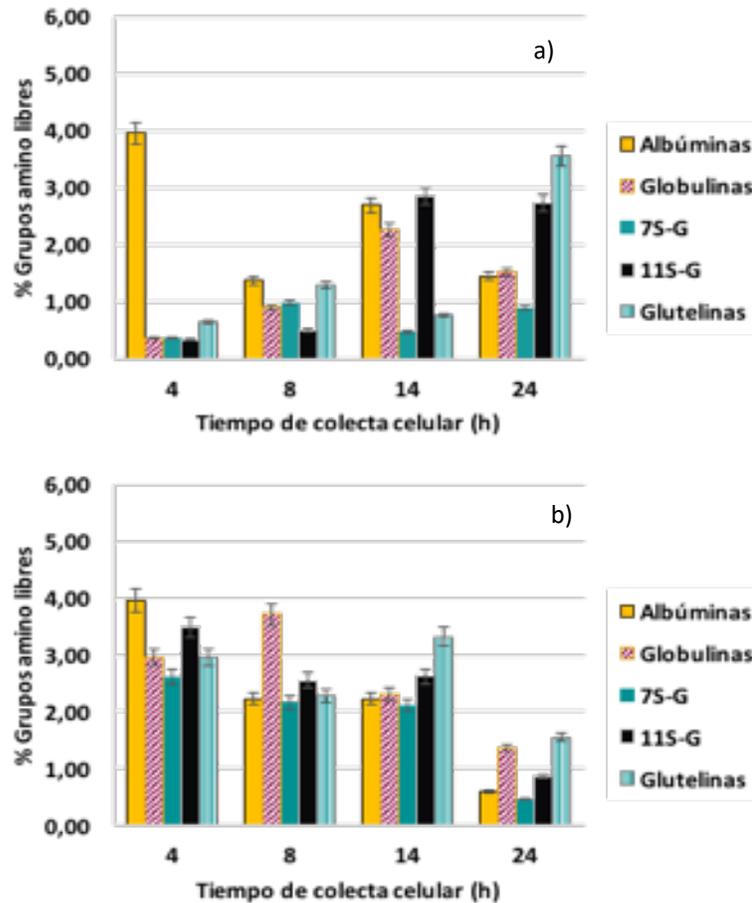


Figura 6.7 Contenido de grupos amino libres después de 14 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva de semilla de amaranto con a) *L. helveticus* y b) *L. plantarum* en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).

Se observó una disminución del contenido de grupos amino libres para los hidrolizados producidos con células de *L. plantarum* colectadas a 24 h. Previamente, se ha reportado que algunas cepas de *L. plantarum* poseen actividades proteolíticas más altas en fase estacionaria temprana (Fadda *et al.*, 1998). En la Figura 6.7a podemos observar que *L. helveticus* mostró un aumento en su actividad proteolítica a medida que avanza la fase de crecimiento. Específicamente, el contenido de aminoácidos libres aumentó desde la fase exponencial temprana (4h) a la fase estacionaria temprana (14 h) en la mayoría de las fracciones, con la excepción de la

fracción de albúmina en la que hubo una disminución de 3.9% a 1.4% en la fase estacionaria tardía (24 h). Los mayores incrementos por acción de *L. helveticus* fueron para las globulinas y las fracciones 11S-G cuando el microorganismo se colectó a las 14 h (fase estacionaria temprana). Estos datos muestran que las actividades de las proteinasas dependen de la fase de crecimiento y la naturaleza de las proteínas presentes en las fracciones.

Después de 24 h de hidrólisis, se puede observar que la fracción de albúminas presenta un mayor grado de proteólisis con células de *L. helveticus* colectadas a 4 y 14 (Figura 6.8a). Con células cosechadas a 24 h existe una mayor concentración de aminoácidos libres en todas las fracciones.

Todas las hidrólisis llevadas a cabo durante 24 h con células de *L. plantarum* cosechadas a 4, 8 y 14 h de cultivo puestas en contacto con las fracciones de reserva, mostraron un mayor grado de proteólisis (Figura 6.8-b). Sin embargo, la menor generación de péptidos se obtuvo con células colectadas a 24 h en todos los tiempos de hidrólisis. La concentración de grupos amino libres durante las hidrólisis está directamente relacionada con el grado de hidrólisis y con el metabolismo bacteriano. Por lo tanto, se generan péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos. Además, se sabe que la hidrólisis proteica depende del requerimiento nutricional específicamente de péptidos y de la especificidad del sistema proteolítico de cada bacteria (Kunji *et al.*, 1996).

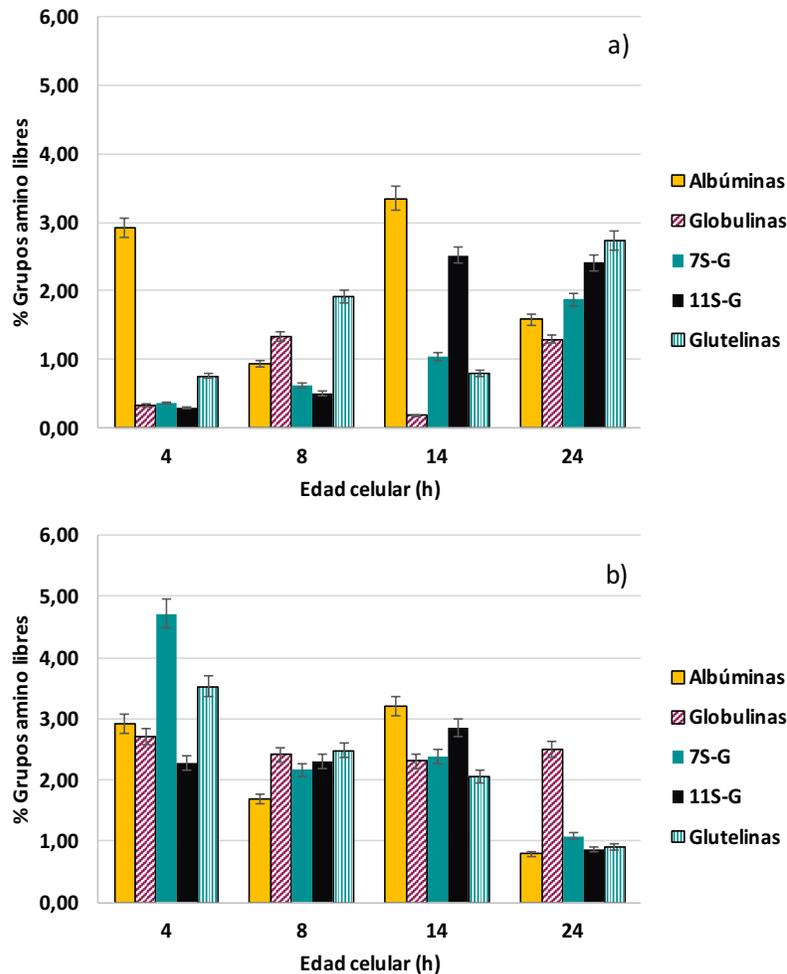


Figura 6.8 Contenido de grupos amino libres después de 24 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva semilla de amaranto con a) *L. helveticus* y b) *L. plantarum* en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas comprende una variedad de componentes que incluyen proteinasas extracelulares unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares que varían en composición y actividades según la especie, la etapa de crecimiento y el nitrógeno disponible (Liu *et al.*, 2010). Por tanto, se esperaba que las proteínas hidrolizadas difirieran en el grado de hidrólisis y, por tanto, en la composición de los péptidos generados y sus actividades biológicas. Estos resultados mostraron que hubo una variación en el contenido de grupos amino libres

dependiendo de la etapa de crecimiento, la cepa de *Lactobacillus*, el tiempo de hidrólisis y la fracción de proteínas. Cuando los recursos de un medio comienzan a limitarse, la tasa de división celular se ralentiza y las bacterias entran en fase estacionaria. Durante este cambio de fase *L. plantarum* REB1 y 13 de MLBPL1 fueron capaces de obtener energía, que probablemente provenga de intermediarios glucolíticos, como sugirió la expresión de piruvato quinasa y una isoforma de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en fase estacionaria temprana. También la presencia en la fase exponencial final de las enzimas aminotransferasa y L-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa, involucradas en el metabolismo de los aminoácidos, indican que los aminoácidos de cadena ramificada presentes en el medio fueron metabolizados parcialmente (Koistinen *et al.*, 2007). Esto sugiere que tal vez enzimas con las mismas características estén presentes en la hidrólisis con bacterias de *L. plantarum* colectadas a 4, 8 y 14 h, puesto que el porcentaje de grupos amino libres se mantuvo entre 2 y 4 % para todas las fracciones de proteína. Sin embargo, Yang *et al.*, (2016) reportaron que *L. plantarum* presentó una baja actividad de proteinasas y que esta actividad está relacionada con la generación de péptidos pequeños y aminoácidos libres durante la hidrólisis de una proteína de pescado. La actividad proteolítica de *L. plantarum* puede liberar en mayor concentración aminoácidos como: el ácido aspártico, ácido glutámico y alanina, tirosina, valina, metionina, fenilalanina y leucina y también de algunos aminoácidos que son precursores de compuestos volátiles. Algunos de estos aminoácidos son responsables de la actividad antioxidante y antihipertensiva.

Esta misma variación de grupos aminos se puede observar en la hidrólisis durante 48 h con ambas especies de *Lactobacillus*. En la Figura 6.9b se muestra que el contenido de grupos amino fue mayor con células de *L. helveticus* comparado con células de *L. plantarum*, especialmente cuando la hidrólisis se llevo a cabo con fracciones de globulinas (7S-G, 11S-G) con células colectadas a 14 h.

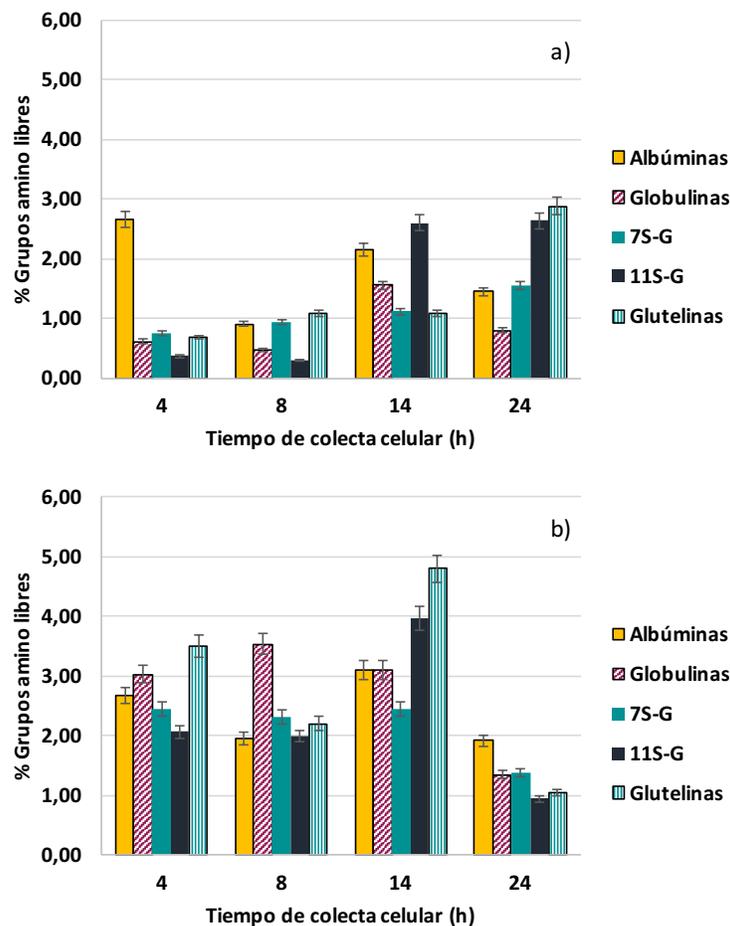


Figura 6.9 Contenido de grupos amino libres después de 48 h de hidrólisis de fracciones de proteína de reserva semilla de amaranto con a) *L. helveticus* y b) *L. plantarum* en diferentes etapas de crecimiento. Las barras representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes (n = 4).

En este trabajo, se encontró que, para algunas fracciones de proteínas, existió un aumento del contenido de grupos amino libres en algunas fases de crecimiento y este fue seguido por una disminución en la fase siguiente. Se han reportado comportamientos similares en proteínas de leches fermentadas con especies de *Lactobacillus* durante 24 y 48 h (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2011). Las proteínas fueron tratadas con *L. plantarum* CRL 685 y mostraron un aumento en la concentración de aminoácidos libres después de 24 h que alcanzó un máximo hasta 48 h a pesar de la lisis celular; esto debido a que la proteinasa asociada a la pared celular contribuyó a

la degradación de las proteínas (Fadda *et al.*, 1998). Varios factores pueden afectar la actividad de las proteasas producidas por especies de *Lactobacillus* y, por tanto, la cantidad de aminoácidos libres cuando se utilizan para obtener hidrolizados de proteínas. La acumulación de péptidos que contienen serina y prolina, por ejemplo, puede inhibir el crecimiento de bacterias lácticas y por lo tanto su actividad proteolítica (Niven *et al.*, 1998). Además, se ha observado que existe una disminución en la concentración de valina, leucina e isoleucina durante la fase temprana de la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis*, pero no en las fases posteriores (Niven *et al.*, 1998). En otro trabajo se encontró una mayor cantidad de prolina, ácido glutámico y ácido aspártico en las proteínas del trigo después de la fermentación con varias especies de *Lactobacillus* (Di Cagno *et al.*, 2002). El *Lactococcus lactis* puede usar la valina y la leucina de algunos de los péptidos y aminoácidos liberados durante la fermentación para su propio crecimiento (Niven *et al.*, 1998). Cualquiera de estos factores puede haber afectado la cantidad de aminoácidos libres que se encuentran en las fracciones de proteínas hidrolizadas de *A. hypochondriacus*. Hay artículos que reportan la correlación entre el contenido de grupos amino libres (es decir, el grado de hidrólisis) de las proteínas alimentarias y sus actividades biológicas (Esfandi *et al.*, 2019a).

Existen reportes donde se estudia el seguimiento de la liberación de péptidos durante la hidrólisis con enzimas digestivas o con enzimas proteolíticas de diferentes fuentes alimenticias. Para el caso del estudio de los péptidos con actividad biológica liberados de la harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) se han empleado principalmente enzimas digestivas, por ejemplo, tripsina con el objetivo de obtener péptidos capaces de inhibir la enzima DPP-IV (Velarde-Salcedo *et al.*, 2013). También reportaron el efecto del tiempo de hidrólisis sobre el perfil de péptidos liberados usando pepsina y pancreatina en hidrolizados de harina no procesada y extruida de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), detectando masas moleculares de 567, 527, 802, 984, 1295, 1545, 2034 y 2064 Da de péptidos que se liberaron durante la hidrólisis. Montoya-Rodriguez *et al.*, (2015), observaron que el tiempo de hidrólisis influye en el perfil peptídico, ya que cuanto más largo es el tiempo de hidrólisis con

pepsina/pancreatina menor es el peso molecular para hidrolizados con de amaranto sin procesar y extrudido. Las secuencias reportadas en este estudio coinciden con secuencias reportadas por otros autores con posibles actividades de inhibición de la enzima ACE que esta a su vez relacionada con el padecimiento de enfermedades crónicas.

Por otra parte, Rizzello *et al.*, (2012) estudiaron la capacidad de las bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus curvatus* SAL33, *Lactobacillus rossiae* CD76, *Lactobacillus brevis* AM7, *Lactobacillus pentosus* 12H6 y *Lactobacillus plantarum* 3DM para liberar el péptido Lunasin durante la fermentación de masas de harinas de trigo, soya, cebada, amaranto y centeno. Estas bacterias se seleccionaron de acuerdo con su actividad de proteinasas durante la fermentación caracterizada por electroforesis SDS-PAGE. La concentración de péptidos de los extractos solubles de las masas fermentadas incrementó con el tiempo de fermentación, siendo los extractos de la masa de amaranto y de soya donde se obtuvieron la mayor concentración de péptidos. La acción de las proteinasas presentes en el sistema proteolítico de *Lactobacillus curvatus* SAL33 y *Lactobacillus brevis* AM7 produjeron las concentraciones más altas de Lunasin.

Sin embargo, los péptidos más estudiados son los obtenidos de la fermentación con bacterias ácido lácticas a partir de leche, caseínas, o suero de leche. Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer actividad inhibitoria de la ACE.

El sistema proteolítico más estudiado ha sido el de *Lactococcus lactis*, esta bacteria también ha sido reportada como generadora de péptidos bioactivos; se ha observado que muchas otras bacterias lácticas producen péptidos bioactivos: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* en conjunto con *Lactococcus lactis* (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Figuroa-Hernández, (2007) realizó un estudio con el objetivo de determinar si el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* expresaba la capacidad de generar secuencias potencialmente bioactivas a partir de las proteínas de la leche. En su

estudio, Figueroa-Hernández (2007) determinó la cantidad de grupos amino libres para medir el grado de hidrólisis de las proteínas de la leche, por el método del ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS). Se probaron tres diferentes concentraciones de sólidos de leche (10, 20 y 30%) para determinar en cual de estos medios se producía una mayor cantidad de péptidos. Se observó que las tres concentraciones de sólidos probadas presentaron tendencias similares, aumentando desde el tiempo 0 hasta llegar a su máximo entre las 28 y 32 horas. De acuerdo con los experimentos realizados se observó que la concentración de sólidos tuvo un efecto en la concentración de grupos amino libres obteniéndose una mayor concentración en las fermentaciones realizadas con el 20% de sólidos. Este estudio dio como resultado la obtención de péptidos con pesos moleculares entre 13.67 a 0.38 kDa potencialmente bioactivos.

Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) realizaron fermentaciones de suero de leche y caseínas con *Lactobacillus casei Shirota* y *Streptococcus thermophilus* aislados de la leche comercial Sofúl con el fin de identificar péptidos con actividad antihipertensiva y antitrombótica. Cabe destacar que, en el caso de las fermentaciones con caseínas, la disminución de grupos amino terminales se puede deber a un pH bajo en el medio de fermentación. Ambas especies de bacterias liberaron péptidos inhibidores de la ACE, mientras que solo *L. casei Shirota* produjo actividad antitrombótica; el mayor porcentaje de esta actividad se observó a las 27 h de fermentación. El *Lactobacillus casei Shirota* mostró un aumento significativo a las 21 h, lo que indica que las condiciones de fermentación pueden influir en el tamaño y la actividad de los péptidos producidos, y esto se puede justificar, dado que el *Streptococcus thermophilus* produjo porcentajes de inhibición de ACE menores al 10% de actividad de inhibición. Se identificó el péptido YQEPVLGPVRGPFPIIV mediante HPLC en los sobrenadantes de la fermentación con *Lactobacillus casei Shirota*. Este péptido mostró una eficiencia de inhibición de 0.14%/concentración de péptido (1 mg/mL).

Por lo anterior se puede observar que el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas puede generar péptidos bioactivos a partir de una fuente de proteína. Lo cual podría ser un indicio para la obtención de péptidos bioactivos a partir de las

fracciones de proteína de reserva del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) aprovechando el sistema proteolítico de *L. plantarum* y *L. helveticus*.

Por esa razón, se seleccionaron dos de las fracciones de proteína de almacenamiento de semillas (albúminas y 11S-G) hidrolizadas por *L. helveticus* y otras dos (glutelinas y 11S G) hidrolizadas por *L. plantarum* con mayor contenido de grupos amino libres para evaluar su actividad biológica.

### 6.2.3 Evaluación de la actividad biológica

Para determinar actividad biológica se seleccionaron los hidrolizados de cuatro fracciones de proteína de *A. hypochondriacus* con el porcentaje más alto de grupos amino libres. Las fracciones de albúmina y 11S-G hidrolizadas con *L. plantarum* y las de glutelinas y 11S-G hidrolizadas con *L. helveticus*, durante 14 h con células colectadas en fase estacionaria temprana, se seleccionaron para evaluar la presencia de actividad antioxidante, quelación de zinc y actividad antihipertensiva. Las fracciones hidrolizadas que mostraron una mejor respuesta a la medición de actividad biológica se ultrafiltraron. De este proceso, se obtuvieron cinco fracciones ultrafiltradas por muestra y se evaluó también su actividad biológica.

#### 6.2.3.1 Actividad Antioxidante en hidrolizados de fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus*

La capacidad de los hidrolizados y fracciones ultrafiltradas para actuar como antioxidantes se evaluó en función de su potencial para reaccionar ante dos especies de radicales comunes, que son los radicales peroxilo (ROO•) e hidroxilo (HO•). La prueba de captación de radicales hidroxilo se usa comúnmente para evaluar la capacidad de donar electrones de un compuesto, mientras que la prueba ORAC se usa generalmente para evaluar la capacidad de donar átomos de hidrógeno.

#### 6.2.3.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

La capacidad de eliminación de radicales ROO• se determinó usando el método que cuantifica la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), que se define como la resistencia de un compuesto a la oxidación inducida por radicales

peroxilo y se basa en la medición de la disminución de la fluorescencia en presencia de captadores de radicales libres (Huang *et al.*, 2002; Somogyi *et al.*, 2007).

Esta prueba se llevó a cabo primeramente en las fracciones de proteína de reserva sin hidrolizar (Figura 6.10) y los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) (TE). La fracción de glutelinas mostró la mayor captación de radicales oxígeno con  $121.5 \pm 18.01 \mu\text{M TE/g}$  de proteína, seguido de la fracción 7S-G con  $76.24 \pm 5.05 \mu\text{M TE/g}$  de proteína y albúmina con  $67.80 \pm 9.76 \mu\text{M TE/g}$  de proteína. Los resultados obtenidos de la medición en las fracciones sin hidrolizar sirvieron como referencia para comparar el efecto antioxidante en los hidrolizados y muestras hidrolizadas ultrafiltradas. Se ha demostrado que los aminoácidos como el triptófano y la tirosina que contienen restos de anillos aromáticos pueden formar radicales intermedios relativamente estables que, a su vez, pueden romper las reacciones en cadena de los radicales. La metionina, es un aminoácido que contiene azufre, y puede oxidarse fácilmente y, por lo tanto, podría prevenir o reducir el daño oxidativo a los componentes de los alimentos (Jodayree *et al.*, 2012).

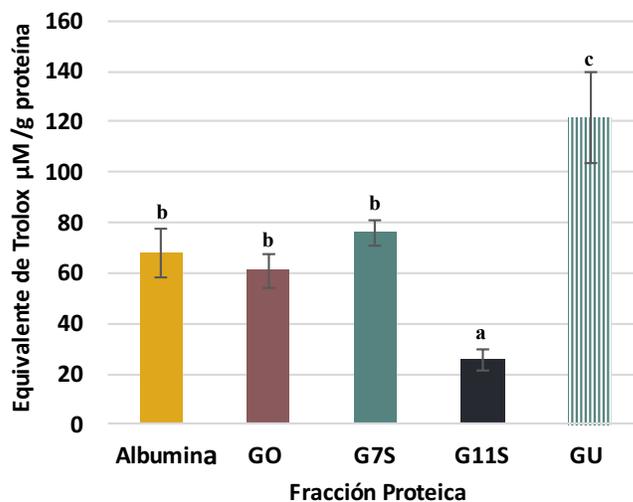


Figura 6.10 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente  $\mu\text{M}$  Trolox/ g de proteína en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

La actividad antioxidante también está asociada con la presencia de cisteína, histidina y fenilalanina, así como con la longitud de los péptidos y la posición de los aminoácidos en la secuencia de la proteína (Sheih *et al.*, 2009).

Durante el tiempo inicial de hidrólisis (4 h) con *L. helveticus*, la actividad de los hidrolizado de la fracción de albúmina fue de  $191 \pm 24 \mu\text{M TE/g}$  de proteína. Se encontró un aumento de 4.5 veces a las 8 h (Figura 6.11a), lo que indica que los polipéptidos presentes en este tiempo de hidrólisis contenían residuos de aminoácidos correctamente posicionados para donar hidrógeno al  $\text{ROO}\cdot$  y así, retardar la descomposición de la fluoresceína. La incubación adicional dio como resultado una disminución gradual y significativa del poder de eliminación del radical en la fracción de albúmina; en los hidrolizados de la fracción 11S-G con *L. helveticus* (Figura 6.11a), se observó la actividad máxima ( $594 \pm 65 \mu\text{M TE/g}$  de proteína) a 14 h de hidrólisis. Los hidrolizados obtenidos de la fracción de glutelinas tras la hidrólisis con *L. plantarum* (Figura 6.11b) fueron los que mostraron mayor resistencia de oxidación en presencia de radicales  $\text{ROO}\cdot$  con valores de ORAC entre  $2179 \pm 157$  y  $2264 \pm 280 \mu\text{M TE}$ . La fracción 11S-G mostró un comportamiento diferente según la especie de *Lactobacillus*. En presencia de *L. helveticus*, la actividad del radical  $\text{ROO}\cdot$  de los hidrolizados de 11S-G aumentó con el tiempo de hidrólisis de 4 a 14 h seguido de una disminución gradual a las 24 y 48 h. Mientras tanto, en presencia de *L. plantarum*, la actividad fue baja en todos los puntos de tiempo de hidrólisis.

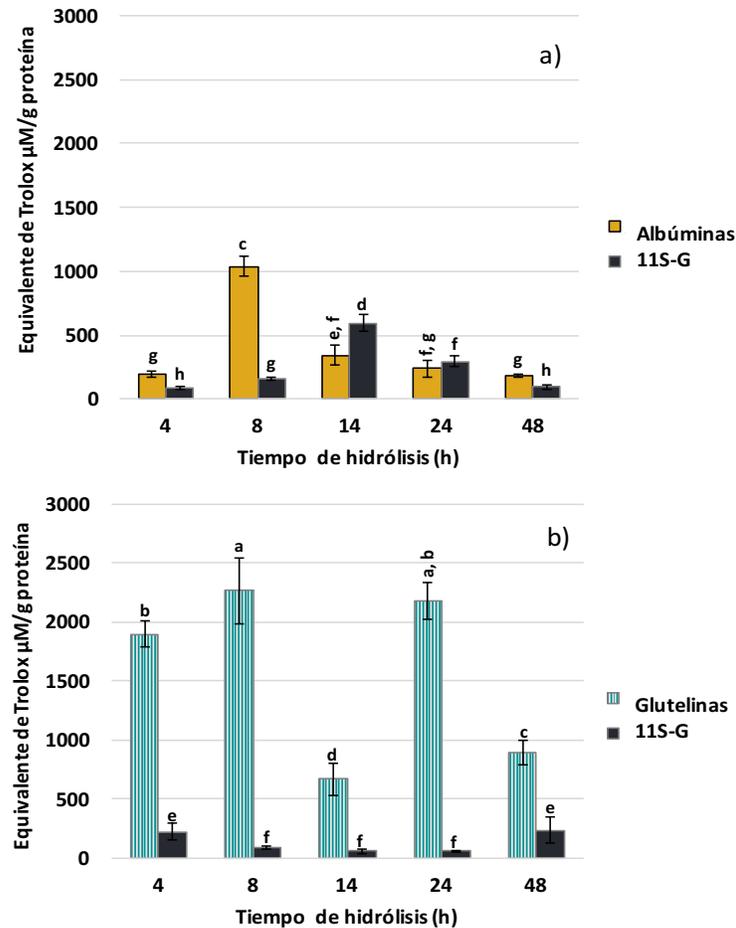


Figura 6.11 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente  $\mu\text{M}$  Trolox en fracciones a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por *L. helveticus* y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por *L. plantarum*, todas con células en fase estacionaria temprana (14h). Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

Con base en estos datos, se puede concluir que las diferencias observadas en los hidrolizados de 11S-G pueden deberse a que las dos especies de *Lactobacillus* poseían proteasas diferentes y, por lo tanto, generan péptidos con diferente tamaño y composición de aminoácidos, lo que marca la diferencia en el poder de captación de radicales oxígeno. Otra explicación podría ser, que las especies de *Lactobacillus* usaron de manera diferente algunos de los aminoácidos y péptidos liberados para su adecuado crecimiento (Liu *et al.*, 2010). Diferentes factores afectan las actividades de

captación de radicales de los péptidos, como: la energía de disociación de enlaces, la hidrofobicidad de la ionización y el tamaño (Leung *et al.*, 2018). Tales factores, aunque no se determinaron como parte de este trabajo, podrían haber tenido una contribución.

La ultrafiltración es un método generalmente utilizado para fraccionar péptidos de rangos de peso molecular definidos. Como se explicó en la metodología, se siguió un proceso de tres pasos para obtener cinco fracciones ultrafiltradas <10, <10-3, <3, <3-1, <1 kDa, usando membranas con diferentes cortes de peso molecular. Solo los hidrolizados obtenidos con *L. plantarum* se consideraron para el proceso de ultrafiltración ya que presentaron una mejor actividad antioxidante.

En la Figura 6.12 se muestra que la fracción ultrafiltrada <3-1 kDa de glutelinas hidrolizadas durante 14 h con *L. plantarum* presenta mayor captación de radicales oxígeno. Mientras que las muestras ultrafiltradas de la fracción de 11S-G mostraron los valores más bajos a la resistencia de oxidación en presencia de radicales ROO•.

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están influenciadas por la masa molecular y por su estructura molecular (Jodayree *et al.*, 2012). La mayoría de los péptidos reportados que exhiben actividad antioxidante son de bajo peso entre 500 y 1800 Da (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Onuh *et al.*, (2014) reportaron que los valores ORAC más altos de los péptidos pequeños pueden deberse a una mayor capacidad para interactuar y donar electrones al radical libre en comparación con péptidos más grandes que pueden tener una capacidad reducida para interactuar con radicales libres. La presencia de residuos de aminoácidos hidrófobos como Ala, Val, Leu o Ile en su extremo N-terminal ha sido reportadas como una característica estructural típica de los péptidos pequeños con actividad antioxidante (Sarmadi y Ismail, 2010). Esta característica se puede observar en algunos de los péptidos identificados (Tabla 6.2). También se ha observado que la presencia de tirosina genera una mayor actividad ORAC entre los aminoácidos libres, por lo que se considera un posible factor que contribuye a la alta actividad antioxidante (Chen *et al.*, 2012).

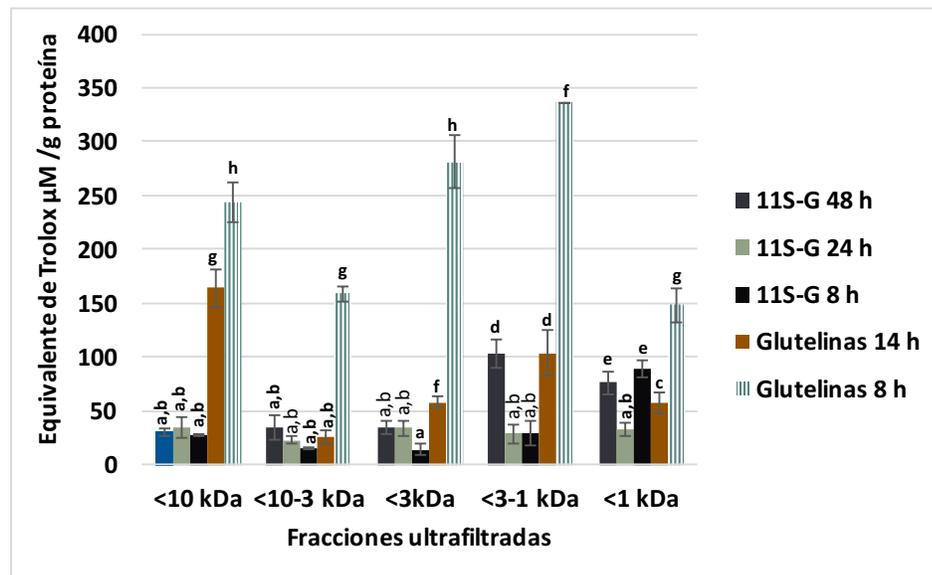


Figura 6.12 Capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) en equivalente  $\mu\text{M}$  Trolox/ g de proteína en fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G generados con *L. plantarum*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

### 6.2.3.3 Captación de radicales hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ )

El radical hidroxilo es el radical libre más reactivo y se puede formar a partir del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en presencia de iones metálicos, como el cobre o el hierro, los radicales hidroxilo reaccionan con lípidos, polipéptidos, proteínas y ADN (Lee *et al.*, 2004). Cuando un radical hidroxilo reacciona con compuestos aromáticos, puede formar un radical hidroxiciclo-hexa dienilo que puede sufrir reacciones adicionales con oxígeno para dar un radical peroxilo, o descomponerse en radicales de tipo fenoxilo por eliminación de agua (Lee *et al.*, 2004). En esta prueba, se generaron radicales hidroxilo mediante la reacción de peróxido de hidrógeno con Fe (II) que se oxidó a Fe (III). La presencia de Fe (II) se midió mediante su reacción con 1,10-fenantrolina generando un compuesto coloreado. La presencia de compuestos antioxidantes inhibió la oxidación de Fe (II) a Fe (III) y la formación de  $\cdot\text{OH}$ , por lo que se favoreció la formación de un compuesto coloreado. Biológicamente, se ha planteado que el radical hidroxilo se genera cuando el peróxido de hidrógeno

reacciona con el ion Fe (II) (reacción de Fenton). Sin embargo, cuando la muestra se mezcla con Fe (II), puede alterar la actividad de Fe (II) por quelación. Por lo tanto, es imposible distinguir si los antioxidantes son simplemente buenos quelantes de metales o eliminadores de  $\bullet\text{OH}$  (Zhang y Zhou, 2019).

Las capacidades de captación de radicales hidroxilo en las fracciones no hidrolizadas de proteína de reserva de *Amaranthus hypochondriacus* se muestran en la Figura 6.13, donde la fracción de globulina mostró una mayor resistencia a la formación de iones hidroxilo de  $112.65 \pm 21.99 \%$  y el menor porcentaje se observó en la fracción de glutelinas ( $18.987 \pm 2.3 \%$ ). Aminoácidos polares como la tirosina, el ácido aspártico, el ácido glutámico y la serina están relacionados con esta actividad, debido a su facilidad de donar un protón al radical (Vanvi y Tsopmo, 2016).

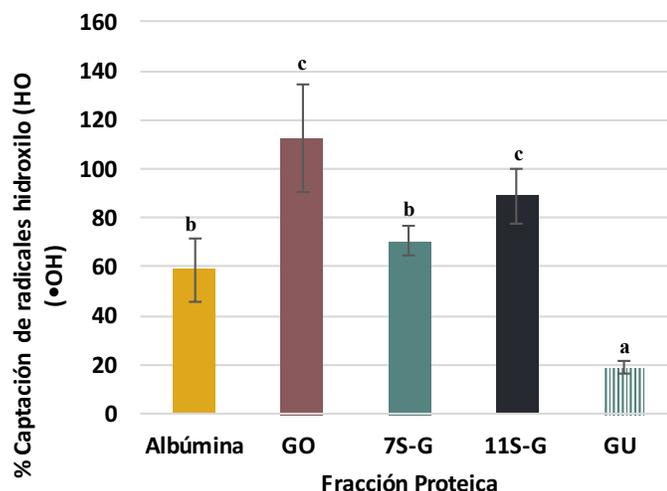


Figura 6.13 Captación de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* no hidrolizadas. Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

La capacidad de captación de radicales  $\bullet\text{OH}$  de los hidrolizados de las fracciones de proteínas de reserva del amaranto se muestran en la Figura 6.14. Los valores más altos se asociaron con los hidrolizados de 11S-G con *L. helveticus* (Figura 6.14a) a las 14 h ( $40.2 \pm 5.7 \%$ ) y 24 h ( $48.7 \pm 4.7 \%$ ), y con los hidrolizados de 11S-G con *L. plantarum* (Figura 6.14b) a las 48 h ( $46.9 \pm 3.3 \%$ ) de hidrólisis. Los hidrolizados

de la fracción de glutelinas tuvieron las actividades más bajas de captación de radicales  $\bullet\text{OH}$  y hubo una disminución gradual con el tiempo de incubación. Todos los hidrolizados de 11S-G mostraron buenas actividades de eliminación de radicales  $\bullet\text{OH}$ , los tiempos de hidrólisis más largos dieron como resultado actividades más altas; contrariamente a los datos de  $\text{ROO}\bullet$  de la medición ORAC. Los hidrolizados de 11S-G con un poder de barrido mínimo de  $\text{ROO}\bullet$  mostraron actividades de  $\bullet\text{OH}$  relativamente buenas hasta de un 46.9 %. Esto probablemente se deba a que la actividad del radical  $\bullet\text{OH}$  depende tanto de la donación de protones como del poder quelante del Fe (II), mientras que la actividad del radical  $\text{ROO}\bullet$  depende de los grupos donantes de electrones o protones (Esfandi *et al.*, 2019b). Se ha reportado que los aminoácidos como el triptófano y la tirosina que contienen restos de anillos aromáticos pueden formar radicales intermedios relativamente estables que, a su vez, pueden romper las reacciones en cadena de los radicales. La metionina, es un aminoácido que contiene azufre y puede oxidarse preferentemente y, por lo tanto, podría prevenir o reducir el daño oxidativo a los componentes de los alimentos (Ngo *et al.*, 2010). Dependiendo de la especie de *Lactobacillus*, la captación del radical  $\bullet\text{OH}$  en la fracción de 11S-G aumentó en los tiempos de hidrólisis finales, pero disminuyó en la fracción de glutelinas (Figura 6.14). En algunos casos, los péptidos más grandes tienen mayor actividad debido a la capacidad de quelar fácilmente el Fe (II) mientras que, en ciertos casos, predomina la capacidad de los péptidos más cortos para donar un protón al radical (Esfandi *et al.*, 2019b).

Las fracciones de proteínas de Amaranto y los hidrolizados con alcalasa han mostrado actividades antioxidantes a través de la prevención a la oxidación del ácido linoleico, la reducción de iones férricos o la captación de radicales ABTS y DPPH (Quintana *et al.*, 2015; Tironi y Añón, 2010). Además, se han usado géneros de las bacterias ácido lácticas específicamente *L. casei* y *S. thermophilus* para fermentar la proteína total del amaranto; donde se produjeron hidrolizados no solo con propiedades antioxidantes sino también antihipertensivas y antitrombóticas; la actividad biológica no solo depende de las proteasas presentes sino también del tipo de fuente proteica (Ayala-Niño *et al.*, 2019b).

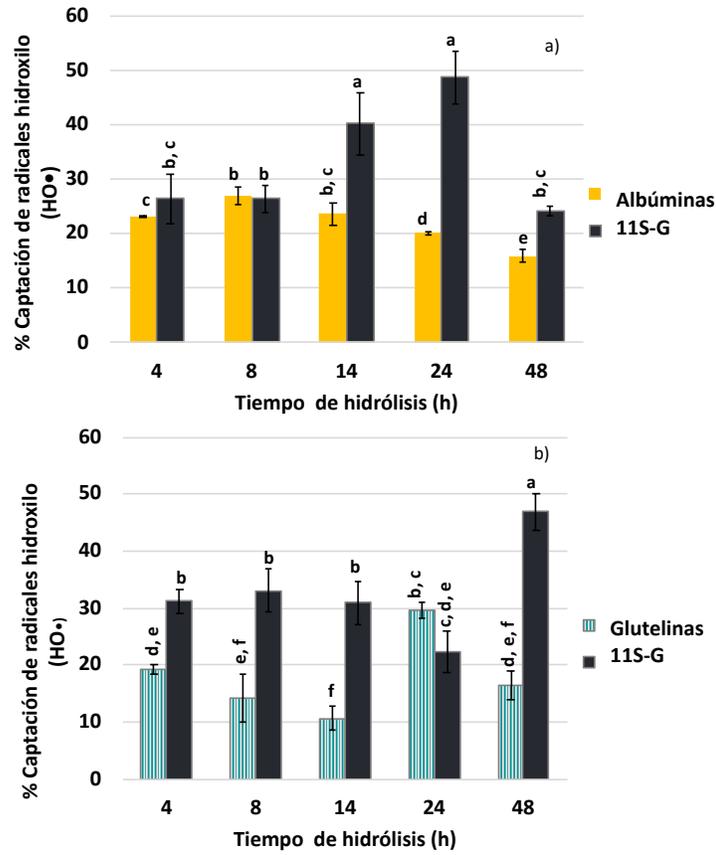


Figura 6.14 Captación de radicales hidroxilo de a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por *L. helveticus* y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por *L. plantarum*, todas con células en fase estacionaria temprana (14h). Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

En la Figura 6.15 se puede observar que todas las fracciones hidrolizadas con *L. plantarum* ultrafiltradas con corte de  $<3-1$  kDa muestran una capacidad mínima de captación de radicales  $\cdot\text{OH}$  de 30 %, se puede observar también que la fracción de 11S-G hidrolizada durante 8 h muestra la mayor captación de radicales hidroxilo con 48 %.

Las muestras ultrafiltradas se comportaron de manera diferente en presencia de radical peroxilo (ensayo ORAC) y radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Esto puede deberse a que la captación de radicales  $\cdot\text{OH}$  depende de los efectos combinados del poder reductor, la donación de átomos de hidrógeno y la captación de oxígeno (Esfandi *et al.*, 2019a)

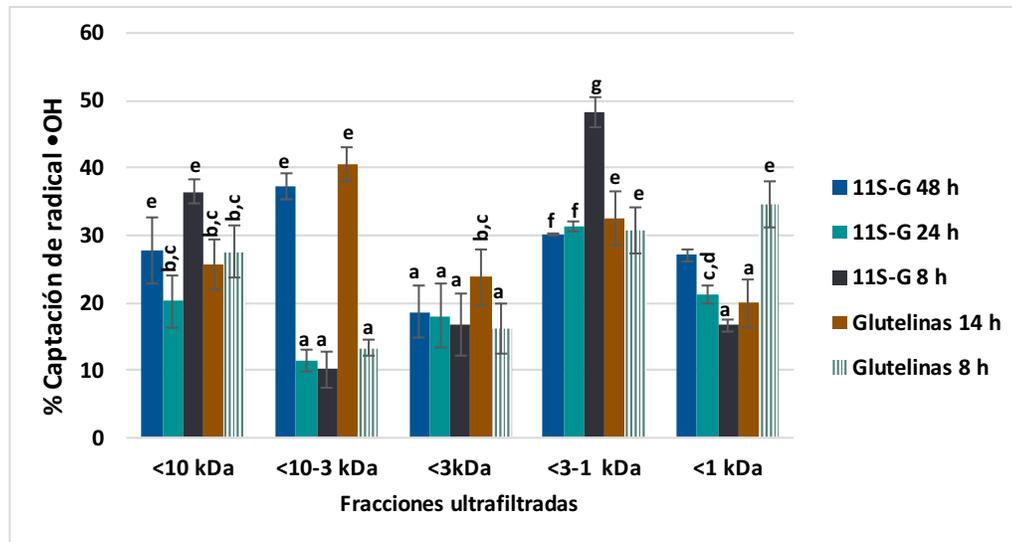


Figura 6.15 Captación de radicales hidroxilo de fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G generados con *L. plantarum*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

La presencia de fenilalanina también puede jugar un papel antioxidante importante en la actividad. Esto se debe a que la fenilalanina posee una fuerte propiedad de captación de radicales, ya que puede atrapar radicales  $\bullet\text{OH}$  a través de la hidroxilación del anillo aromático que conduce a la formación de o-, m- o p-tirosina estable (Naughton y Grootveld, 2001). También se ha observado que una fracción de bajo peso molecular de los hidrolizados de proteína de garbanzo con una fuerte actividad de eliminación de  $\bullet\text{OH}$  tiene concentraciones más altas de aminoácidos hidrófobos, como fenilalanina, isoleucina, leucina y valina, así como metionina y lisina en comparación con otras fracciones de alto peso molecular (Pownall *et al.*, 2010).

Pownall *et al.*, (2011) demostraron que existe una fuerte correlación entre la actividad de eliminación de radicales hidroxilo y el porcentaje total de aminoácidos hidrofóbicos presentes en las fracciones hidrolizadas de proteína de chícharo. Por tanto, la presencia de péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos hidrofóbicos pudieron haber contribuido a la captación de radicales hidroxilo en las fracciones de <3-1 kDa en comparación con las otras fracciones de péptidos con un tamaño de péptido <1 kDa.

#### 6.2.4 Capacidad de quelación de Zinc de las fracciones de *Amaranthus hypochondriacus*

En la Figura 6.16 se muestra la capacidad de quelación de zinc de las fracciones proteicas del *Amaranthus hypochondriacus* no hidrolizadas, donde se observa que la fracción de glutelinas obtuvo un  $21.48 \pm 3.14$  % mayor que el generado por el resto de las fracciones de proteína de reserva.

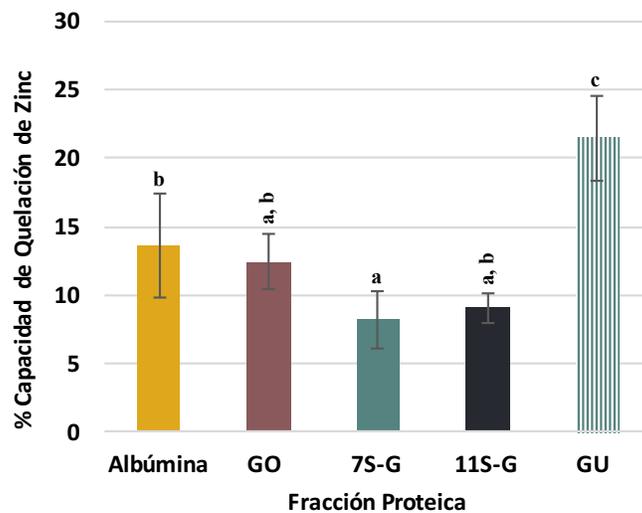


Figura 6.16 Capacidad de quelación de Zinc de las fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* no hidrolizadas Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

Se determinó la capacidad de quelación de zinc para mostrar si existió una interacción entre sitio catalítico de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y los péptidos generados durante la hidrólisis de las proteínas de amaranto con lactobacilos. La ACE consta de dos dominios, que son el dominio N y el dominio C y ambos contienen en su sitio activo un ion de zinc, el cual la enzima lo usa como cofactor; por esa razón, los agentes quelantes de metales pueden inhibir la actividad de la ACE (Aluko, 2015; Deddish *et al.*, 1994).

Para el caso de la actividad antihipertensiva, las interacciones entre los inhibidores de la ACE y el  $Zn^{2+}$  en el sitio activo de la enzima suelen desempeñar

funciones muy importantes regulando la actividad de la ACE (FitzGerald y Meisel, 2000). La capacidad de quelación de zinc de los hidrolizados se muestra en la Figura 6-17. Las muestras de la fracción 11S-G hidrolizada con ambas especies de *Lactobacillus* exhibieron una mayor capacidad de quelación de zinc comparadas con las muestras de las otras fracciones. En la Figura 6.17b se puede observar que las muestras de la fracción de 11S-G hidrolizada durante 24 y 48 h con *L. plantarum* exhibieron la mayor capacidad de quelación de zinc (40 %). Es probable que las proteasas que conforman a esta bacteria tengan afinidad por algunos sitios de la proteína 11S-G, por lo que son capaces de realizar una mejor quelación de zinc durante la hidrólisis, dado que en la fracción sin hidrolizar se obtuvo un  $9 \pm 1.05$  %. Sin embargo, la mayor quelación de zinc de los hidrolizados con 11S-G con *L. helveticus* fue  $34.1 \pm 3.36$  % después de 24 h de hidrólisis.

La variación de la quelación del zinc durante el tiempo de hidrólisis no solo está relacionada con la presencia de aminoácidos con capacidad para donar electrones, sino también con su ubicación específica dentro de la cadena peptídica. Hay datos sobre la capacidad de zinc de los hidrolizados de proteínas en muchos alimentos como el trigo, la leche y el pescado (Udechukwu *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2015) pero a menudo no se producen utilizando microorganismos.

Wang *et al.*, 2011 reportaron que, a un tiempo de hidrólisis más largo, la capacidad de unión de zinc de los hidrolizados de caseína de yak (YCH) disminuyó, lo que concluyó que la hidrólisis está relacionada con la reacción de unión entre YCH y los iones de zinc. Sin embargo, en la Figura 6.17 se observa que la mayor capacidad de quelación al zinc se detectó en tiempos de hidrólisis más largos, 24 y 48 h; lo que podría indicar que la fuente de proteína es un factor importante que contribuye a la capacidad de quelación de metales. Por otra parte, Zhu *et al.*, 2015 identificaron un péptido quelante de zinc a partir de hidrolizados de germen de trigo con alcalasa y observaron que la presencia de residuos de histidina en el extremo N-terminal del péptido puede desempeñar un papel importante en la capacidad de unión de zinc.

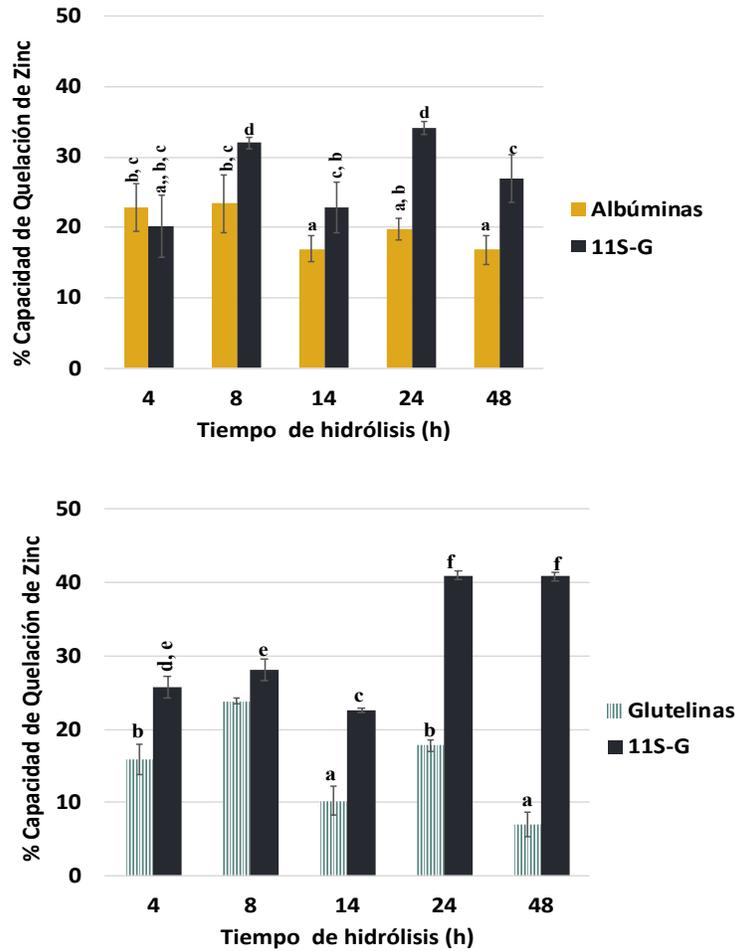


Figura 6.17 Capacidad de quelación de zinc de a) Albúmina y 11S-G hidrolizadas por *L. helveticus* y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por *L. plantarum*, todas con células en fase estacionaria temprana (14 h). Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

Los hidrolizados de las fracciones de glutelinas y de 11S-G mostraron una capacidad de quelación de zinc de 23 y 28 % respectivamente después de 8 h de hidrólisis con *L. plantarum* (Figura 6.17). Las muestras a este tiempo de hidrólisis se seleccionaron para ultrafiltración. Después de la ultrafiltración, los componentes de la fracción de glutelinas <10 kDa (Figura 6.18) mostraron un aumento en la capacidad de quelación de zinc del  $28 \pm 2.3$  %, mientras que la fracción ultrafiltrada <1kDa de 11S-

G mostró una mayor quelación de zinc del 36 %. En algunos trabajos se ha encontrado una relación entre el tamaño de los péptidos y las capacidades quelantes de los metales, mientras que otros no. Esto se debe a que, aunque el tamaño del péptido puede jugar un papel importante, factores como la especificidad de las proteasas, la posición de los residuos quelantes dentro de las secuencias de péptidos son también importantes (Udechukwu *et al.*, 2016; Walters *et al.*, 2018a).

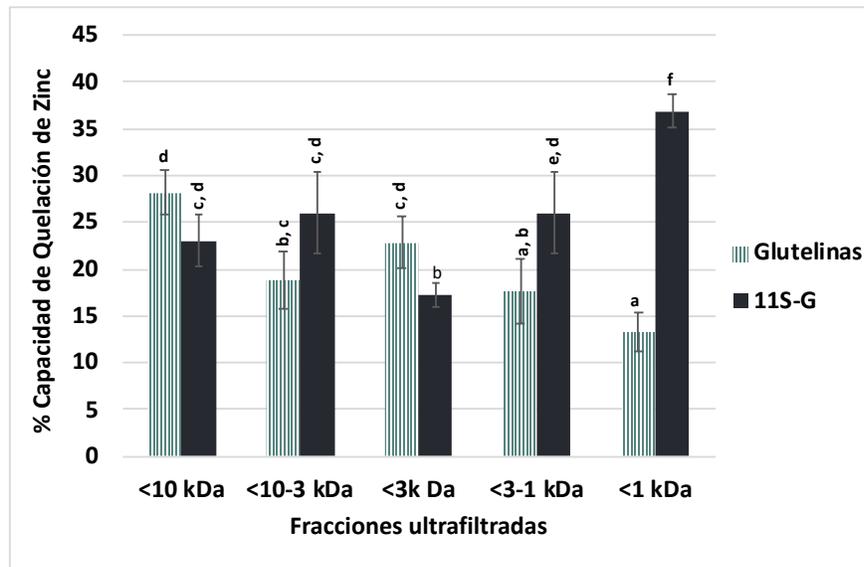


Figura 6.18 Capacidad de quelación de Zinc de fracciones ultrafiltradas obtenidas de Glutelinas y 11S-G hidrolizadas durante 8 h con *L. plantarum*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

### 6.2.5 Actividad antihipertensiva de las fracciones de *Amaranthus hypochondriacus*

La enzima convertidora de angiotensina-I es una dipeptidilcarboxipeptidasa involucrada en la regulación de la presión arterial y el equilibrio de electrolitos. Esta enzima tiene una doble acción en el sistema renina-angiotensina-aldosterona al separar dos aminoácidos de la angiotensina-I (decapéptido), liberando angiotensina-II (octapéptido), un poderoso vasoconstrictor, y al mismo tiempo inactivando a la bradiquinina, un potente péptido vasodilatador (Erdmann *et al.*, 2008b; Erdös *et al.*, 2010).

Los inhibidores de la ACE, como captopril, perindopril,trandolapril y benzapril, son potentes inhibidores que actúan sobre los dominios C- y -N terminal de la enzima (Natesh *et al.*, 2004; Tzakos *et al.*, 2003). Los inhibidores de la ACE generalmente contienen un residuo de prolina en su lado C-terminal (Daskaya-Dikmen *et al.*, 2017). Se ha demostrado que aminoácidos hidrofóbicos presentes en el extremo -N terminal, la presencia de aminoácidos cargados positivamente en el medio y aminoácidos aromáticos en el extremo C- terminal, son características de los péptidos inhibidores de la ACE (Wu *et al.*, 2006). Estos aminoácidos interactúan con la enzima a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en ambos dominios de la ACE y también interactúan directamente con el ion  $Zn^{2+}$  situado en su centro catalítico (Andújar-Sánchez *et al.*, 2004; Natesh *et al.*, 2004; Natesh *et al.*, 2003). Además de coordinarse directamente con el  $Zn^{2+}$ , los inhibidores de la ACE pueden alterar la estructura conformacional de la enzima.

Es necesario mencionar que no se encontró actividad de inhibición de la enzima ACE en las fracciones de proteína de reserva del *Amaranthus hypochondriacus*.

En la Figura 6.19 se muestra la actividad de inhibición de la ACE de las muestras hidrolizadas. La presencia de algunos aminoácidos como leucina, treonina e histidina, lisina y valina tienen una fuerte influencia en la unión de la ACE (Hanafi *et al.*, 2018) los cuales pudieron estar presentes en mayor concentración durante la hidrólisis de la fracción de glutelinas y 11S-G con *L. plantarum* pues en donde se observa una mayor inhibición de ACE en comparación con los porcentajes de inhibición obtenidos con *L. helveticus* (Figura 6.19b). Entre las secuencias de péptidos identificadas se demostró que leucina, lisina, valina e histidina están presentes en los hidrolizados con esta bacteria; esto se explica en la sección 6.3.

La variación en la actividad antihipertensiva de los péptidos liberados se atribuye a la composición e hidrofobicidad de la estructura primaria de la proteína (Wu *et al.*, 2006). Los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos pueden unirse a los sitios catalíticos de la ACE, actuando como inhibidores competitivos (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2011). Los datos mostraron que las muestras de hidrolizados con *L. helveticus* exhibieron una baja inhibición de la ACE (Figura 6.19a). En algunos momentos de

hidrólisis no se detectó inhibición. Sin embargo, para los hidrolizados de la fracción de glutelinas y 11S-G a las 8 h de proteólisis generados por *L. plantarum* (Figura 6.19b), mostraron un 45 % de inhibición de la ACE, la cual resultó ser la más alta inhibición observada, incluso que el captopril ( $41.3 \pm 2.268$  %). Ayala-Niño *et al.*, (2019b) reportaron que la mayor actividad de inhibición de la ACE se obtuvo en hidrolizados de proteína total del amaranto con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* 54102 en monocultivo a las 36 h de fermentación. Sus resultados finales revelaron que una mayor concentración de grupos amino se relacionó con una mayor actividad antihipertensiva. Tovar-Pérez *et al.*, (2009) obtuvieron fracciones de péptidos inhibidores de la ACE a partir de la albúmina 1 y globulina de semilla de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizada con alcalasa donde la actividad de inhibición de la ACE más alta fue del 40 % a las 18 h para la albúmina 1 y del 35 % a las 15 h para la globulina. Comparando estos resultados con los obtenidos con *L. plantarum* hubo una mayor inhibición por parte del microorganismo a un tiempo menor a 8 h en la fracción de glutelinas. Las diferencias entre porcentajes de inhibición, se puede deber a que aminoácidos con cargas positivas en la secuencia en la posición C-terminal. La presencia de ácido glutámico en el extremo C-terminal del péptido, puede quelar el zinc del centro activo de la ACE (Iwaniak *et al.*, 2014). Como el péptido ALEP que parece unirse al  $Zn^{2+}$  a través del residuo de ácido glutámico presente en la secuencia, el cual es su modo de unión más frecuente (Vecchi y Añón, 2009).

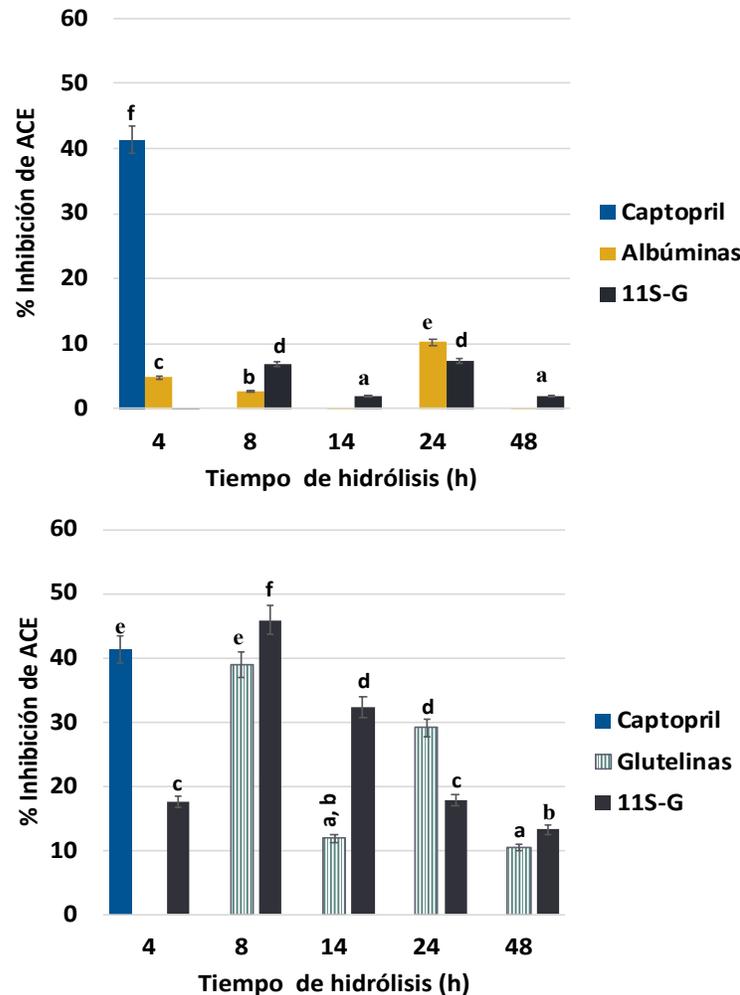


Figura 6.19 Actividad de Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en muestras de Albúminas y 11S-G hidrolizadas por *L. helveticus* y b) Glutelinas y 11S-G hidrolizadas por *L. plantarum*, todas con células en fase estacionaria temprana. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

Solo los hidrolizados a 8 h con *L. plantarum* de las fracciones de glutelinas y 11S-G se seleccionaron para ultrafiltración. En la Figura 6.20 se muestran los resultados obtenidos con las muestras ultrafiltradas, donde la fracción de glutelinas  $<3- <1$  kDa exhibió una inhibición de la ACE del 84 %. Todas las fracciones ultrafiltradas mostraron una mayor inhibición que el captopril. También se observó un aumento en la actividad de inhibición de la ACE para la fracción de 11S-G, donde se obtuvo una

inhibición del 63 y 68 % en las fracciones ultrafiltradas en <3 kDa y <3-1 kDa, respectivamente. Estos resultados sugirieron que los péptidos inhibidores de la ACE presentes en las fracciones de proteína de amaranto se generaron principalmente por la hidrólisis con *L. plantarum* en fase exponencial. La actividad de inhibición de la ACE está asociada con péptidos de bajo peso molecular (Vecchi y Añón, 2009). García-Moreno *et al.* (2015) obtuvieron péptidos antihipertensivos a partir de la hidrólisis de la proteína total de lenteja con alcalasa y savinasa, donde los péptidos con el mayor efecto de inhibición fueron los que presentaron secuencias de aminoácidos cortas. (Segura Campos *et al.*, 2013) demostraron que los hidrolizados de proteína de chía (*Salvia hispanica L.*) con alcalasa- flavorzyme ultrafiltrados en una membrana con corte de peso molecular de <1 kDa exhibieron un 69.31 % de inhibición de la ACE. Esto coincide con lo obtenido, dado que la mayor inhibición se observó en las fracciones con rango de <3-1 kDa. Las actividades de inhibición de la ACE se asocian con péptidos de tamaño pequeño (García-Moreno *et al.*, 2015), es por eso que en las fracciones ultrafiltradas mostraron la mayor inhibición de ACE. Hayes *et al.*, (2016) demostraron que los hidrolizados con alcalasa de una proteína de pescado menores a <3 kDa inhiben la ACE en 85.8 % a 1 mg/mL en comparación con el 68.7 y 74.0 % de nuestros datos para las fracciones de 11S-G y glutelinas.

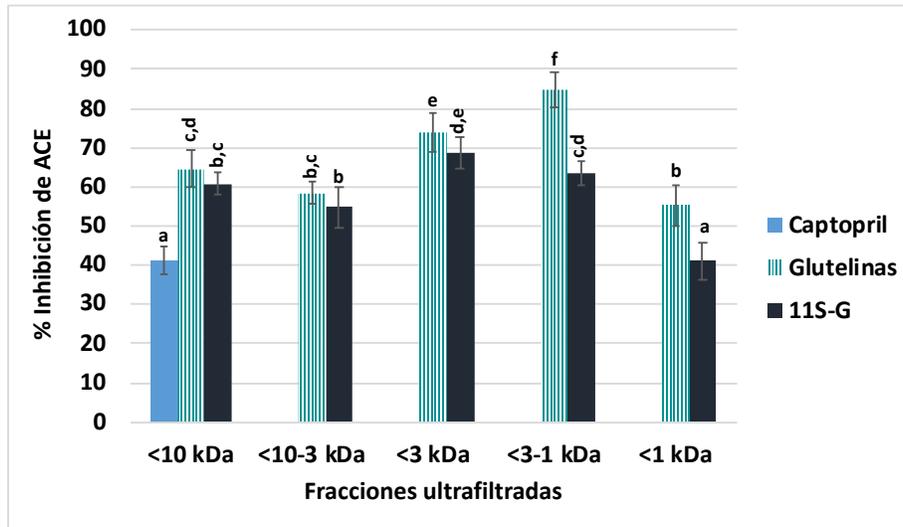


Figura 6.20 Inhibición de la ACE de fracciones ultrafiltradas de los hidrolizados de Glutelinas y 11S-G a 8 h generados con *L. plantarum*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa entre las medias de los grupos ( $P < 0.05$ ).

En este trabajo de investigación se concluye que no hubo correlación entre los datos de quelación de zinc y la inhibición de la ACE. La fracción de glutelinas hidrolizadas con *L. plantarum* durante 8 h tuvieron mayor actividad en ambas pruebas. Este hidrolizado y el siguiente inhibidor de la ACE más alto (11S-G con *L. plantarum*) fueron seleccionados para fraccionamiento y evaluación de sus posibles actividades biológicas.

### 6.3 Péptidos identificados por nLC-MS/MS en muestras de proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas por *L. plantarum*.

Las fracciones proteicas hidrolizadas y ultrafiltradas de 11S-G (48 h) <10-3 kDa, GU (14 h) <10-3 kDa, GU (8 h) <3-1 kDa, obtenidas a diferentes tiempos de hidrólisis con *L. plantarum* se analizaron mediante nLC-MS/MS para identificar péptidos con potencial actividad biológica.

Se buscaron péptidos con actividad biológica cifrados dentro de la secuencia de las fracciones de proteína de reserva del *Amaranthus hypochondriacus* a través de fuentes bioinformáticas ya existentes. Para la identificación, se utilizó Scaffold; una herramienta utilizada para validar experimentos proteómicos basados en el análisis

MS/MS. Scaffold emplea varios enfoques algorítmicos para asegurar la confianza en el proceso de identificación de péptidos a partir de secuencias de proteínas conocidas (Searle, 2010). Las búsquedas se realizaron en diferentes bases de datos que almacenan información de secuencias de proteínas como Swiss-Prot, NCBI, UniProt. Las identificaciones de proteínas se determinaron utilizando Scaffold versión 4.11 y se aplicó un umbral de probabilidad de proteína del 95 %. La información obtenida del análisis de MS/MS fue útil para identificar péptidos de *Amaranthus hypochondriacus* que se han reportado previamente y luego se evaluó el perfil de péptidos bioactivos utilizando las bases de datos BIOPEP y Uniprot.

Se utilizaron otras bases de datos como, PepBank, Inspect, International Peptide Index y DFBB (Base de datos de péptidos bioactivos derivados de alimentos) para lograr identificar las secuencias y su posible actividad biológica. DFBB es una base de datos donde todos los datos se integran manualmente mediante la integración Recuperación de datos-Extracción-Información de literatura previamente reportada. En esta base de datos se enumeran los péptidos de las secuencias de las proteínas aglutinina y globulina 11S. La información que aporta la base de datos es la secuencia, longitud, posición, ID y resultados BLAST de péptidos. Además, en esta base de datos, se puede realizar una predicción de hidrólisis enzimática obteniendo el número de escisiones y las posiciones de los sitios de escisión dependiendo de la enzima.

Los péptidos identificados se caracterizaron en términos de su masa observada /carga ( $m/z$ ), masas moleculares esperadas y calculadas. La lista de péptidos identificados en estas muestras se presenta en las Tablas 6.2. Las secuencias de péptidos identificadas forman parte de la estructura primaria de las proteínas globulina 11S, AmA1, LEA (*Amaranthus cruentus*) y de la proteína inhibidora de tripsina. La mayoría de los péptidos identificados en este trabajo que poseen secuencias de aminoácidos con actividad de inhibición de la ACE previamente reportada como ALEPT y VIKP (Vecchi y Añón, 2009), se encuentran asociados a la estructura de la proteína globulina 11S presente en fracciones de <10-3 kDa de 11S-G y <10-3 kDa de GU con una variación menor en sus secuencias. Dos secuencias; GLHVIKPP y HVIKPPSRA se reportan como inhibidores de la enzima ACE y además con

actividades como antioxidante, de inhibición de DPP-4 y de captación de glucosa. Los aminoácidos como tirosina (Y), histidina (H), triptófano (W), valina (V) y arginina (R), presentes en varios de los péptidos identificados pueden haber contribuido no solo a la actividad de inhibición de la ACE sino también a la actividad antioxidante en las fracciones ultrafiltradas (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2006).

Las secuencias AAIERENP AAIERENPN LVGEYGYK MGEPEEDDPIKTTRP TFGMGEPEEDDPIKTTRP no han sido previamente reportadas. Vilcacundo *et al.*, 2019 reportaron que las secuencias de FLISCLL, SVFDEELS y DFIIIE contienen fenilalanina (F), la cual podría ser determinante en la inhibición de la ACE de *Amaranthus caudatus*. Este aminoácido también está presente en algunos de los péptidos identificados en este trabajo con actividad de inhibición de la ACE. (Ayala-Nino *et al.*, 2019a) identificaron dentro de la secuencia de las proteínas de almidón sintasa I, cistatina y aglutinina del *Amaranthus hypochondriacus*. dos posibles péptidos antihipertensivos VRWS y LVRW y concluyeron que el Triptófano (W) podría ser el aminoácido que interaccione con el sitio activo de ACE, produciendo así su inhibición. Los resultados obtenidos sugieren que a través de la hidrólisis de las fracciones proteicas de globulinas 11S y glutelinas de *Amaranthus hypochondriacus* con bacterias ácido lácticas, se pueden generar péptidos con actividad antihipertensiva principalmente por lo cual los hidrolizados podrían usarse como ingrediente natural de alimentos funcionales.

Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015 reportaron las secuencias: GVSEEIAQK (inhibidor de la ACE), LTALEPTNR (inhibidor de la ACE), VNVDDPSKA (inhibidor de la DPP-4), HVIKPPSRA (inhibidor de la ACE; antioxidante; activador mediado por ubiquitina) y LTALEPTNR (inhibidor de la ACE), estas secuencias identificadas a partir de un estudio *in silico* en la proteína de reserva globulina 11S, fueron también identificadas en este trabajo en las fracciones proteicas hidrolizadas con *L. plantarum*. Además, la secuencia de aminoácidos LAVNVDDPSKA está incluida dentro de la secuencia del péptido LPNGVEETICSAR**LAVNVDDPSK**ADVY que a la vez se encuentran en la proteína globulina 11S y ha sido reportado como inhibidor de la ACE; inhibidor de DPP-4; captador de glucosa y antioxidante. Por otra parte, la secuencia

LVVVPQNFAIV generada a partir de la hidrólisis de la fracción de glutelinas a 14 h con *L. plantarum*: (Tabla 6.2) se encuentra incluida dentro del péptido DEELSRGQLVVVPQNFAIVKQAFE generado del estudio *in silico* utilizando alcalasa como enzima de corte sobre proteínas de amaranto, que también se ha reportado como inhibidor de la ACE (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015).

Vilcacundo *et al.* (2019), utilizaron BioTools y MASCOT para identificar péptidos del concentrado de proteína de kiwicha bajo digestión gastrointestinal *in vitro*, en donde la secuencia HVIKPPS se identificó como un péptido antioxidante. En este estudio a partir de la hidrólisis con *L. plantarum* a 48 h de la fracción 11S-G se generó la secuencia HVIKPPSRA que contiene dos aminoácidos más. Orsini Delgado *et al.*, (2016) identificaron péptidos antioxidantes a través de una digestión gastrointestinal simulada con pepsina a partir de las proteínas de *Amaranthus mantegazzianus*. Las secuencias reportadas coinciden con las generadas a partir de la hidrólisis con bacterias lácticas. En la Tabla 6.2 se enlistan las secuencias AWEEREQGSR, HVIKPPSRA, AVNVDDPSKA que forman parte de la secuencia total de la proteína de reserva de Globulina 11S. Se ha reportado que AWEEREQGSR es un péptido antioxidante que se encuentra en las regiones expuestas de la subunidad ácida de la globulina 11S con residuos aromáticos (Orsini Delgado *et al.*, 2016). Luna-Suarez *et al.*, (2008) caracterizaron la subunidad ácida de la proteína de semilla de amaranto 11S reportando del análisis por espectrometría de masas usando las bases de datos NCBI nr y MASCOT 13 secuencias de péptidos, incluidas las secuencias identificadas en este trabajo AWEEREQGSR y LTALEPTNR con actividad antioxidante y de inhibición de la ACE respectivamente.

Todos estos péptidos se han identificado principalmente dentro de la secuencia de la fracción de proteína de reserva 11S-G. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de *LEA Amaranthus cruentus* y la proteína precursora de inhibidor de tripsina no se han reportado previamente en ningún estudio *in silico* o *in vivo*

Tabla 6.2 Secuencia de péptidos identificados por nLC-MS/MS en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas con *L. plantarum*.

Fracción	Masa Observada	Masa Calculada	Secuencia	Posición	Proteína	UniProtKB i.d	Actividad Biológica	
<3-1 kDa G11S 8 h	480,7539	959,4933	<b>GVSEEIAQK</b>	241-255	<i>11S</i> <i>Globulina</i>	A2I9A6	ACE-Inhibidor	
	507,7829	1.013,5512	<b>LTALEPTNR</b>	41-49			ACE-Inhibidor	
	451,2405	900,4665	<b>TALEPTNR</b>	41-49			ACE-Inhibidor	
	472,7380	943,4614	<b>VNVDDPSKA</b>	309-318			ACE-Inhibidor	
	645,632	1.933,87	FGMGPEEEDDPIKTTRP	154-168	<i>LEA</i> <i>Amaranthus</i> <i>cruentus</i>	A0A2K8FR49	Sin definir	
	679,3134	2.034,92	TFGMGPEEEDDPIKTTRP	152-168				
	506,7748	1.011,53	AAIIERENP	28-36	<i>Inhibidor de</i> <i>Tripsina</i>	Q9SNV6	Sin definir	
	563,7965	1.125,58	AAIIERENPN	28-37				
	464,7423	927,4701	LVGEYGYK	20-27				
<10-3 kDa G11S 48 h	521,2885	1.040,56	<b>ALEPTNRIQ</b>	41-49	<i>11S</i> <i>Globulina</i>	A2I9A6	ACE-Inhibidor	
	416,5309	1.246,57	<b>AWEEREQGSR</b>	282-286			Antioxidante	
	480,7538	959,4931	<b>GVSEEIAQK</b>	241-255			ACE-Inhibidor	
	537,2957	1.072,58	<b>GVSEEIAQKL</b>	247-256			ACE-Inhibidor	
	601,3252	1.200,64	<b>GVSEEIAQKLQ</b>	247-260			Captador de glucosa-	
	502,8037	1.003,59	<b>HVIKPPSRA</b>	274-282			Antioxidante	
	564,7987	1.127,58	<b>LAVNVDDPSKA</b>	309-318				
	486,2615	970,5084	<b>LEPTNRIQ</b>	41-49			DPP-4	
	507,7825	1.013,55	<b>LTALEPTNR</b>	41-49			Inhibidor	
	514,2987	1.026,58	<b>NIVRVQEGL</b>	264-268			Antioxidante	
	623,2894	1.244,56	<b>QAEQDDRGIV</b>	257-279			Antioxidante	
	452,2404	900,4662	<b>TALEPTNR</b>	43-47			ACE-Inhibidor	
	571,8121	1.141,61	<b>TALEPTNRIQ</b>	43-50			ACE-Inhibidor	
								ACE-Inhibidor
		577,6019	2.034,92	MGEPEEEDDPIKTTRP			154-168	<i>LEA</i> <i>Amaranthus</i> <i>cruentus</i>
	679,3152	2.034,92	TFGMGPEEEDDPIKTTRP	152-169				

Tabla 6.2 Continuación. Secuencia de péptidos identificados por nLC-MS/MS en fracciones proteicas de *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas con *L. plantarum*.

Fracción	Masa Observada	Masa Calculada	Secuencia	Posición	Proteína	UniProtKB i.d	Actividad Biológica
<10-3 kDa GU 14 h	579,7932	1.157,57	DVHDFNVISL	249-264	<i>AmA1</i>	Q8S390	ACE-Inhibidor- Antioxidante
	449,766	897,5175	<b>KILDPLAQ</b>	38-45			Antioxidante
	523,2999	1.044,59	<b>KILDPLAQF</b>	38-46			Antioxidante
	507,8076	1.013,60	TAILEIIEI	292-304			DPP-4 Inhibidor ACE-Inhibidor- Antioxidante
	657,8304	1.313,65	<b>ALEPTNRIQAEA</b>	43-55	<i>11S Globulina</i>	A2I9A6	ACE-Inhibidor ACE-Inhibidor Antioxidante
	430,7711	859,5276	<b>GLHVIKPP</b>	269-281			
	481,2586	960,5027	<b>GLKFNRP</b> E	461-463			ACE-Inhibidor ACE-Inhibidor ACE-Inhibidor ACE-Inhibidor- Antioxidante
	487,2509	972,4873	<b>GNIVRVQEG</b>	264-268			
	523,2614	1.044,51	<b>GRIQIVNDQ</b>	377-378			
	551,7723	1.101,53	<b>GRIQIVNDQ</b> G	377-380			
	602,3089	1.202,60	<b>GVSEEIAQKLQ</b>	247-260			
	664,4028	960,5027	<b>LVVVPQNFAIVK</b>	397-410			
	475,7503	949,4861	<b>PETTLFRS</b>	466-474			ACE-Inhibidor DPP-4 Inhibidor
	519,2669	1.036,52	<b>PETTLFRSS</b>	466-476			
	494,7511	987,4874	<b>RIQIVNDQ</b>	264-268			
	672,8358	1.343,66	<b>TALEPTNRIQAE</b>	43-47			
708,3543	1.414,69	<b>TALEPTNRIQAEA</b>	43-50				
						ACE-Inhibidor	

Las letras en negrita indican que la secuencias ha sido reportada como bioactivas. Nomenclatura de aminoácidos: C, cys; cisteína; H, su; histidina; Yo, ile; isoleucina; M, conocido; metionina; S, ser; serina; V, val; valina; A, ala; alanina; G, gly; glicina; L, leu; leucina; P, pro; prolina; T, thr; treonina; F, fenilalanina; R, arg; arginina; Y, tyr; tirosina; W, trp; triptófano; D, asp; ácido aspártico; N, asn; asparagina; E, glu; ácido glutámico; Q, ginebra; glutamina; K, lys; lisina.

Las fracciones de proteína de reserva del *Amaranthus hypochondriacus* hidrolizadas con ambas especies de *Lactobacillus* mostraron actividad antioxidante y antihipertensiva. El análisis por espectrometría de masas permitió la identificación de los péptidos liberados durante la hidrólisis con *L. plantarum*. Estos péptidos podrían ser utilizados como ingredientes en el desarrollo de alimentos funcionales o como medicamentos para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Se necesitan futuras investigaciones para validar estos resultados utilizando los péptidos de manera individual para confirmar e investigar su bioactividad y mecanismo de acción.

## 7 CONCLUSIONES

- ◆ La caracterización de las proteínas de reserva de semilla de amaranto por SDS-PAGE y espectrometría de masas mostró que la mayoría de las fracciones (globulinas, IIS-G, 7S-G y glutelinas) estaban compuestas por polipéptidos cuya secuencia corresponde con la de las proteínas: aglutinina, albúmina A1 (AmA1) y globulina 11S, con excepción de la fracción de albúminas. La cistatina solo se identificó en la fracción de albúmina.
- ◆ *Lactiplantibacillus plantarum* demostró una mayor capacidad de hidrólisis sobre todas las fracciones proteicas de semilla de amaranto en todas las fases de crecimiento evaluadas.
- ◆ A 14 h de hidrólisis con bacterias en fase estacionaria temprana (14 h), se alcanzaron porcentajes de proteólisis de al menos 2% en la mayoría de las fracciones.
- ◆ La hidrólisis de fracciones proteicas de semilla de amaranto con *L. plantarum* y *L. helveticus* permitió la liberación de péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante y de quelación de zinc.
- ◆ El análisis de los hidrolizados de proteína de amaranto por espectrometría de masas permitió la identificación de péptidos con actividad biológica antihipertensiva, antioxidante y de captación de glucosa, siendo los más abundantes aquellos con actividad de inhibición de la ACE y con actividad antioxidante.
- ◆ Los péptidos se identificaron principalmente dentro de la secuencia de la fracción de proteína de reserva 11S-G.
- ◆ Las secuencias de aminoácidos presentes en *LEA Amaranthus cruentus* y la proteína precursora de inhibidor de tripsina no se han reportado previamente en ningún estudio *in silico* o *in vivo*.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch James, L.E. 2006. Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agr Food Chem.* 27(6):1256-1262.
- Akin, I., Pamela, E., Odunola, Oyeronke, A., Gbadegesin, Michael, A., Oke, Abiola, Orkpeh y Uterdzua. 2013. Assessment of the protein quality of twenty nine grain amaranth (*Amaranthus spp.* L.) accessions using amino acid analysis and one-dimensional electrophoresis. *Afr J Biotechnol.* 12(15):1802-1810.
- Aluko, R.E. 2015. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Curr. Opin. Food Sci.* 4:44-50.
- Andújar-Sánchez, M., Cámara-Artigas, A. y Jara-Pérez, V. 2004. A calorimetric study of the binding of lisinopril, enalaprilat and captopril to angiotensin-converting enzyme. *Biophys Chem.* 111(2):183-189.
- Avanza, M.V. y Añón, M.C. 2007. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *J Sci Food Agr.* 87(4):616-623.
- Axelsson, L. y Ahrné, S. 2000. Lactic acid bacteria. p. 367-388. En: Applied microbial systematics. Editado. Place) Published: Springer.
- Ayala-Niño, A., Rodriguez-Serrano, G.M., Gonzalez-Olivares, L.G., Contreras-Lopez, E., Regal-Lopez, P. y Cepeda-Saez, A. 2019a. Sequence Identification of Bioactive Peptides from Amaranth Seed Proteins (*Amaranthus hypochondriacus spp.*). *Molecules.* 24(17).
- Ayala-Niño, A., Rodriguez-Serrano, G.M., Jimenez-Alvarado, R., Bautista-Avila, M., Sanchez-Franco, J.A., Gonzalez-Olivares, L.G. y Cepeda-Saez, A. 2019b. Bioactivity of Peptides Released During Lactic Fermentation of Amaranth Proteins with Potential Cardiovascular Protective Effect: An *In Vitro* Study. *J Med Food.* 22(10):976-981.
- Barba de la Rosa, A.P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O. y Viroben, G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J Agr Food Chem.* 40(6):931-936.
- Beganović, J., Kos, B., Pavunc, A.L., Uroić, K., Džidara, P. y Šušković, J. 2013. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe.* 20:58-64.

- Bewley, J.D. y Marcus, A. 1990. Gene Expression in Seed Development and Germination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 38:165-193.
- Borjórquez-Balam, E., Ruiz Ruiz, J.C., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D. y Chel Guerrero, L. 2013. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *OmniaScience Monographs*.
- Bray, T.M. 2000. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. 16(7-8):578-581.
- Breene, W. 1991. Food uses of grain amaranth. *Cereal foods world*. 36(5):426-430.
- Bressani, R. y Garcia-Vela, L.A. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J Agr Food Chem*. 38(5):1205-1209.
- Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen, R., Hughes, J., Welker, D., De Carvalho, V., Tompkins, T., Ardö, Y., Vogensen, F. y De Lorentiis, A. 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J Dairy Sci*. 94(9):4313-4328.
- Broadbent, J.R. y Steele, J.L. 2005. Cheese Flavor and the Genomics of Lactic Acid Bacteria-Genomics and molecular biology are valuable in helping to define how these bacteria contribute to the flavor and texture of cheeses. *ASM News*. 71(3):121-128.
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G.F. y Beresford, T. 2008. Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.* 190(2):727-735.
- Caselato-Sousa, V.M. y Amaya-Farfan, J. 2012. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *J Food Sci*. 77(4):R93-104.
- Castellani, O.F., Martínez, E.N. y Añón, M.C. 1998. Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *J Agric Food Chem*. 46(12):4846-4853.
- Castellani, O.F., Martínez, E.N. y Añón, M.C. 2000. Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *J Agric Food Chem*. 48(11):5624-5629.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F. y Wu, J. 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Res. Int*. 2014.
- Chatterton, D.E., Smithers, G., Roupas, P. y Brodkorb, A. 2006. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—Technological implications for processing. *Int. Dairy J*. 16(11):1229-1240.
- Chen, H., Huang, J., Cao, B., Chen, L., Song, N. y Lei, N. 2018. Study of extraction and enzymatic properties of cell-envelope proteinases from a novel wild *Lactobacillus plantarum* LP69. *Catalysts*. 8(8):325.

- Christensen, J.E. y Steele, J.L. 2003. Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.* 185(11):3297-3306.
- Correa, A.D., Jokl, L. y Carlsson, R. 1986. Chemical constituents, in vitro protein digestibility, and presence of antinutritional substances in amaranth grains. *Arch Latinoam Nutr.* 36(2):319-326.
- Cremonesi, P., Chessa, S. y Castiglioni, B. 2013. Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. *Front. Microbiol.* 3:435.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. y Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.* 109(1):144-148.
- Cushman, D. y Cheung, H. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20(7):1637-1648.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H. y Ozcelik, B. 2017. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients.* 9(4).
- de Mejia, E.G., Wang, W. y Dia, V.P. 2010. Lunasin, with an arginine-glycine-aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. *Mol Nutr Food Res.* 54(3):406-414.
- Deddish, P.A., Wang, J., Michel, B., Morris, P.W., Davidson, N.O., Skidgel, R.A. y Erdös, E.G. 1994. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. *P Natl A Sci India B.* 91(16):7807-7811.
- DeFelice, S. L. 1995. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Sci Technol.* 6(2), 59-61.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M. y Gobbetti, M. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol.* 68(2):623-633.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. y Shah, N.P. 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait.* 87(1):21-38.
- Duan, C., Li, S., Zhao, Z., Wang, C., Zhao, Y., Yang, G., Niu, C., Gao, L., Liu, X. y Zhao, L. 2019. Proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* strains in cheddar cheese as adjunct cultures. *J Food Protect.* 82(12):2108-2118.
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Metro, F., Haertle, T. y Chobert, J. 2004. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft.* 59(11):653-656.

- Elias, R.J., Kellerby, S.S. y Decker, E.A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(5):430-441.
- Erdmann, K., Cheung, B.W. y Schroder, H. 2008a. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 19(10):643-654.
- Erdmann, K., Cheung, B.W. y Schröder, H. 2008b. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 19(10):643-654.
- Erdös, E.G., Tan, F. y Skidgel, R.A. 2010. Angiotensin I–Converting Enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension.* 55(2):214-220.
- Esfandi, R., Walters, M.E. y Tsopmo, A. 2019a. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon.* 5(4):e01538.
- Esfandi, R., Willmore, W.G. y Tsopmo, A. 2019b. Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their in vitro antioxidant and metal chelating properties. *Food Chem.* 279:49-57.
- Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P. y Oliver, G. 1998. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dryfermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Science.* 49(1):11-18.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. y Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18(10):872-879.
- Fernández, M., Benito, M.J., Martín, A., Casquete, R., Córdoba, J.J. y Córdoba, M.G. 2016. Influence of starter culture and a protease on the generation of ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausage “salchichón”. *Heliyon.* 2(3):e00093.
- Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V. y Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microb.* 66(11):4772-4778.
- Fidantsi, A. y Doxastakis, G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids Surf. B.* 21(1-3):119-124.
- Figueroa-Hernández, C. 2007. Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.
- FitzGerald, R.J. y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Brit J Nutr.* 84(S1):33-37.
- Fitzgerald, R.J. y Murray, B.A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol.* 59(2):118-125.

- FitzGerald, R.J., Murray, B.A. y Walsh, D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr. Health.* 134(4):980S-988S.
- Freedman, R. y Radda, G. 1968. The reaction of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. *Biochem. J.* 108(3):383-391.
- Frigerio, L., Hinz, G. y Robinson, D.G. 2008. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic.* 9(10):1564-1570.
- Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson, D. y Nyborg, N.C. 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and *in vivo*. *A Van Leeuw J Microb.* 83(1):27-34.
- García-Moreno, P.J., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A. y Guadix, E.M. 2015. Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards. *J Funct Foods.* 18:95-105.
- Gatti, M., Trivisano, C., Fabrizi, E., Neviani, E. y Gardini, F. 2004. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1):182-190.
- Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V. y Lortal, S. 2009. prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10):3238-3249.
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R. y Mulligan, C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Int Food Res J.* 37(2):123-131.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R. y Atlan, D. 1997. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy Res.* 64(4):561-571.
- Giraffa, G. 2014. *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. *Front. Microbiol.* 5:338.
- Goldstein, E.J., Tyrrell, K.L. y Citron, D.M. 2015. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 60(suppl\_2):S98-S107.
- Gonzalez-Gonzalez, 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. *Int. J. Dairy Sci.* 21(9):615-622.
- Goodwin, J.F. y Choi, S.-Y. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzenesulfonic acid. *Clin Chem.* 16(1):24-31.
- Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H.H., Weisz, M. y Trakhtenberg, S. 2001. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular

dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *J Agric Food Chem.* 49(11):5595-5601.

Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L.J. y Arruda, P. 1991. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J Agric Food Chem.* 39(5):851-854.

Gorinstein, S., Zemser, M. y Paredes-López, O. 1996. Structural stability of globulins. *J Agric Food Chem.* 44(1):100-105.

Hanafi, M.A., Hashim, S.N., Chay, S.Y., 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 Res. Int.* 106:589-597.

Hancock, R.E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases.* 1(3):156-164.

Hartmann, R. y Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 18(2):163-169.

Hayakari, M., Kondo, Y. y Izumi, H. 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal. Biochem.* 84(2):361-369.

Hayes, M., Mora, L., Hussey, K. y Aluko, R.E. 2016. Boarfish protein recovery using the pH-shift process and generation of protein hydrolysates with ACE-I and antihypertensive bioactivities in spontaneously hypertensive rats. *Innov Food Sci Emerg.* 37:253-260.

Hernández, G. y Herrerías, G. 1998. Amaranto: Historia y promesa. *Tehuacán: Horizonte del tiempo.* 1:529.

Hernandez-Ledesma, B., C Hsieh, C. y O De Lumen, B. 2013. Chemopreventive properties of Peptide Lunasin: a review. *Protein Pept. Lett.* 20(4):424-432.

Hernandez-Ledesma, B., del Mar Contreras, M. y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci.* 165(1):23-35.

Hernandez-Ledesma, B., Recio, I. y Amigo, L. 2008. Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids.* 35(2):257-265.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. y Deemer, E.K. 2002. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem.* 50(7):1815-1821.

Iwaniak, A. y Minkiewicz, P. 2007. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.* 6(3):5-15.

- Iwaniak, A., Minkiewicz, P. y Darewicz, M. 2014. Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13(2):114-134.
- Jacobsen, S.-E. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador: Informe sobre los rubros quinua, chocho y amarantol.: Editorial Abya Yala,
- Jay, J.M. 2000. Fermentation and fermented dairy products. p. 113-130. En: Modern food microbiology. Editado. Place) Published: Springer.
- Jeong, H.J., Lee, J.R., Jeong, J.B., Park, J.H., Cheong, Y.K. y de Lumen, B.O. 2009. The cancer preventive seed peptide lunasin from rye is bioavailable and bioactive. *Nutr Cancer*. 61(5):680-686.
- Jodayree, S., Smith, J.C. y Tsopmo, A. 2012. Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. *Food Res Int*. 46(1):69-75.
- Kayser, H. y Meisel, H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS letters*. 383(1-2):18-20.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E. y Aebersold, R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*. 74(20):5383-5392.
- Kenny, O., FitzGerald, R., O'cuinn, G., Beresford, T. y Jordan, K. 2003. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J*. 13(7):509-516.
- Kitts, D.D. y Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des*. 9(16):1309-1323.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M. y Fiers, M.W. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *P Nat A Sci*. 100(4):1990-1995.
- Koistinen, K.M., Plumed-Ferrer, C., Lehesranta, S.J., Kärenlampi, S.O. y Von Wright, A. 2007. Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Lett*. 273(1):12-21.
- Kok, d.J. y De Vos, W. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria. p. 169-210. En: Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Editado. Place Published: Springer.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. y Nakatani, N. 1991. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical

- properties and the putative localization in the grains. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 55(11):2745-2750.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. y Nakatani, N. 2014. Extraction of Two Albumin Fractions from Amaranth Grains: Comparison of Some Physicochemical Properties and the Putative Localization in the Grains. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 55(11):2745-2750.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9(16):1297-1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J.* 16(9):945-960.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *A Van Leeuw J Microb.* 70(2):187-221.
- Laakso, K., Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., Savijoki, K., Nyman, T.A. y Kalkkinen, N. 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. *Microb Biotechnol.* 4(6):746-766.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- LeBlanc, J., Matar, C., Valdez, J., LeBlanc, J. y Perdigon, G. 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci.* 85(11):2733-2742.
- Lee, J., Koo, N. y Min, D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci F.* 3(1):21-33.
- Leung, R., Venus, C., Zeng, T. y Tsopmo, A. 2018. Structure-function relationships of hydroxyl radical scavenging and chromium-VI reducing cysteine-tripeptides derived from rye secalin. *Food Chem.* 254:165-169.
- Liu, C.-J., Wang, R., Gong, F.-M., Liu, X.-F., Zheng, H.-J., Luo, Y.-Y. y Li, X.-R. 2015. Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5-2 isolated from fermented soybean. *Genomics.* 106(6):404-411.
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A. y Siezen, R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genom.* 11(1):1-15.
- Lohner, K. y Blondelle, S. 2005. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8(3):241-256.
- López Expósito, I. y Recio, I. 2006. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int Dairy J.* 16(11):1294-1305.

- Lule, V.K., Garg, S., Pophaly, S.D. y Tomar, S.K. 2015. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J Food Sci.* 80(3):R485-R494.
- Luna-Suarez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernandez, A. y Paredes-Lopez, O. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnol J.* 3(2):209-219.
- Maldonado-Cervantes, E., Huerta-Ocampo, J.A., Montero-Morán, G.M., Barrera-Pacheco, A., Espitia-Rangel, E. y Barba de la Rosa, A.P. 2014. Characterization of *Amaranthus cruentus* L. seed proteins by 2-DE and LC/MS–MS: Identification and cloning of a novel late embryogenesis-abundant protein. *J Cereal Sci.* 60(1):172-178.
- Marcone, M.F. 1999. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chem.* 65(4):533-542.
- Marcone, M.F. y Yada, R.Y. 1991. Isolation, purification, and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 55(9):2281-2289.
- Marcone, M.F. y Yada, R.Y. 1992. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *J Agr Food Chem.* 40(3):385-389.
- Marcuse, R. 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *J Am Oil Chem Soc.* 39(2):97-103.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L. y Tolbert, N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87(1):206-210.
- Martínez, E.N. y Añón, M.C. 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J Agr Food Chem.* 44(9):2523-2530.
- Martínez, E.N., Castellani, O.F. y Añón, M.C. 1997. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J Agr Food Chem.* 45(10):3832-3839.
- Martirosyan, D.M., Miroshnichenko, L.A., Kulakova, S.N., Pogojeva, A.V. y Zolodov, V.I. 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis.* 6(1):1-12.
- Marx JL. 1977. Amaranth: a comeback for the food of the aztecs? *Science.* 198 (4312): 40.
- Matsui, T., Yuki-yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of nutritional biochemistry.* 13(2):80-86.
- Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y. y Hernández-Sánchez, H. 2012. *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy

properties. *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications*. Pérez Campos A., Mena AL (eds). Nova Publishing, New York, USA. 1-31.

Mercier, A., Gauthier, S.F. y Fliss, I.I. 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int Dairy J.* 14(3):175-183.

Moller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. y Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.* 47(4):171-182.

Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M.A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. y González de Mejía, E. 2015. Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14(2):139-158.

Morales-Camacho, J.I., Paredes-López, O., Espinosa-Hernández, E., Velasco, D.A.F. y Luna-Suárez, S. 2016. Expression, purification and thermal stability evaluation of an engineered amaranth protein expressed in *Escherichia coli*. *Electron. J. Biotechnol.* 22:44-51.

Mota, C., Nascimento, A.C., Santos, M., Delgado, I., Coelho, I., Rego, A., Matos, A.S., Torres, D. y Castanheira, I. 2016. The effect of cooking methods on the mineral content of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus* sp.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *J Food Comp Anal.* 49:57-64.

Nakajima, H., Kunji, E.R., Poolman, B. y Konings, W.N. 1998. Amino acid transport in *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158(2):249-253.

Natesh, R., Schwager, S.L., Evans, H.R., Sturrock, E.D. y Acharya, K.R. 2004. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochem.* 43(27):8718-8724.

Natesh, R., Schwager, S.L., Sturrock, E.D. y Acharya, K.R. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature.* 421(6922):551-554.

Naughton, D.P. y Grootveld, M. 2001. EDTA bis-(ethyl phenylalaninate): a novel transition metal-ion chelating hydroxyl radical scavenger with a potential anti-inflammatory role. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 11(19):2573-2575.

Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E. y Aebersold, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 75(17):4646-4658.

Ngo, D.-H., Qian, Z.-J., Ryu, B., Park, J.W. y Kim, S.-K. 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J Func Foods.* 2(2):107-117.

Niven, G.W., Knight, D.J. y Mulholland, F. 1998. Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *J Dairy Res.* 65(1):101-107.

- Onuh, J.O., Girgih, A.T., Aluko, R.E. y Aliani, M. 2014. *In vitro* antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* 150:366-373.
- Orsini Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Anon, M.C. y Tironi, V.A. 2016. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chem.* 197 Pt B:1160-1167.
- Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins.: Longmans, Green and Company,
- Pan, D., Guo, H., Zhao, B. y Cao, J. 2011. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 21(13):3898-3904.
- Paredes López, O., Barba de la Rosa, A., Hernandez López, D. y Carabez Trejo, A. 1990. Amaranto: características y aprovechamiento industrial. *Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, DC.*
- Paško, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Chłopiczka, J., Iżewska, A., Gawlik, M., Gawlik, M. y Gorinstein, S. 2011. Effect of amaranth seeds in diet on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Food Chem.* 126(1):85-90.
- Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. y Arteaga, G.E. 2004. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J Sci Food Agr.* 84(14):1908-1918.
- Plate, A.Y. y Arêas, J.A. 2002. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chem.* 76(1):1-6.
- Pownall, T.L., Udenigwe, C.C. y Aluko, R.E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J Agric Food Chem.* 58(8):4712-4718.
- Pownall, T.L., Udenigwe, C.C. y Aluko, R.E. 2011. Effects of cationic property on the *in vitro* antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Int Food Res J.* 44(4):1069-1074.
- Quintana, L., Hernández, A., María del P, R. y Santos, J. 2015. The antioxidant activity of peptides isolated from *Amaranthus* on normal human skin *in vitro* and inflammatory cytokines detection. *Nutr. Food Sci.*
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A. y Browdy, C.L. 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture.* 310(1-2):130-138.
- Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R. y Gobbetti, M. 2012. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutr Cancer.* 64(1):111-120.

- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J.P., Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay, M. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int Dairy J.* 26(2):147-154.
- Rutherford-Markwick, K.J. y Moughan, P.J. 2005. Bioactive peptides derived from food. *J AOAC Int.* 88(3):955-966.
- Saint-Sauveur, D., Gauthier, S.F., Boutin, Y. y Montoni, A. 2008. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int Dairy J.* 18(3):260-270.
- Samaranayaka, A.G. y Li-Chan, E.C. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Funct Foods.* 3(4):229-254.
- Sarmadi, B.H. y Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides.* 31(10):1949-1956.
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(4):394-406.
- Searle, B.C. 2010. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics.* 10(6):1265-1269.
- Segura Campos, M.R., Peralta Gonzalez, F., Chel Guerrero, L. y Betancur Ancona, D. 2013. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. *Int J Food Sci.* 2013:158482.
- Segura-Nieto, M. 1994. Biochemistry of Amaranth Proteins. *Amaranth: Biotogy, Chemistry, and Technology.* 75-106.
- 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. *J Agr Food Chem.* 40(9):1553-1558.
- Sheih, I.-C., Wu, T.-K. y Fang, T.J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technol.* 100(13):3419-3425.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. y Tatham, A.S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell.* 7(7):945-956.
- Silva-Sanchez, C., de la Rosa, A.P., Leon-Galvan, M.F., de Lumen, B.O., de Leon-Rodriguez, A. y de Mejia, E.G. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem.* 56(4):1233-1240.
- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G., Beresford, T. y Ross, R. 2010. Invited review: *Lactobacillus helveticus*—a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J Dairy Sci.* 93(10):4435-4454.

- Smacchi, E. y Gobbetti, M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microb.* 17(2):129-141.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. y Nagy, G. 2007. Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 28(4):R41.
- Terán, W.I.C., Vilcacundo, R. y Carpio, C. 2015. Compuestos bioactivos derivados de amaranto y quinua Bioactive components derived from amaranth and quinoa. *Actualización en Nutrición.* 16(1):18-22.
- Tironi, V.A. y Añón, M.C. 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Res. Int.* 43(1):315-322.
- Todorov, S.D. y Franco, B.D.G.D.M. 2010. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Rev. Int.* 26(3):205-229.
- Torres-Llanez, M.d.J., Vallejo-Cordoba, B. y González-Córdova, A.F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Arch Latinoam Nutr.* 55(2):111-117.
- 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 Chem.* 116(2):437-444.
- Tzakos, A.G., Galanis, A.S., Spyroulias, G.A., Cordopatis, P., Manessi-Zoupa, E. y Gerothanassis, I.P. 2003. Structure–function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl-activation and peptide hydrolysis mechanisms. *Protein Eng.* 16(12):993-1003.
- Udechukwu, M.C., Collins, S.A. y Udenigwe, C.C. 2016. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides. *Food Funct.* 7(10):4137-4144.
- Udechukwu, M.C., Downey, B. y Udenigwe, C.C. 2018. Influence of structural and surface properties of whey-derived peptides on zinc-chelating capacity, and in vitro gastric stability and bioaccessibility of the zinc-peptide complexes. *Food Chem.* 240:1227-1232.
- Udechukwu, M.C., Tsopmo, A., Mawhinney, H., He, R., Kienesberger, P.C. y Udenigwe, C.C. 2017. Inhibition of ADAM17/TACE activity by zinc-chelating rye secalin-derived tripeptides and analogues. *RSC Adv.* 7(42):26361-26369.
- Ueno, K., Mizuno, S. y Yamamoto, N. 2004. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. *Lett Appl Microbiol.* 39(4):313-318.
- Vanvi, A. y Tsopmo, A. 2016. Pepsin Digested Oat Bran Proteins: Separation, Antioxidant Activity, and Identification of New Peptides. *J Chem.* 2016:1-8.
- Vecchi, B. y Añón, M. 2009. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochem.* 70(7):864-870.

- Velarde-Salcedo, A.J., Barrera-Pacheco, A., Lara-Gonzalez, S., Montero-Moran, G.M., Diaz-Gois, A., Gonzalez de Mejia, E. y Barba de la Rosa, A.P. 2013. *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem.* 136(2):758-764.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int J Food Microb.* 96(2):149-164.
- Vilcacundo, R., Martinez-Villaluenga, C., Miralles, B. y Hernandez-Ledesma, B. 2019. Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein under *in vitro* gastrointestinal digestion. *J Sci Food Agric.* 99(3):1225-1232.
- Vioque, J. y Millán, F. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. y Millán, F. 2000. Bioactive peptides in storage proteins. *Grasas y Aceites.* 51(5):361-365.
- Walters, M.E., Esfandi, R. y Tsopmo, A. 2018a. Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods.* 7(10).
- Walters, M.E., Udenigwe, C.C. y Tsopmo, A. 2018b. Structural Characterization and Functional Properties of Proteins from Oat Milling Fractions. *J AOCS.* 95(8):991-1000.
- Wang, W. y De Mejia, E.G. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4(4):63-78.
- Wang, X., Zhou, J., Tong, P. y Mao, X. 2011. Zinc-binding capacity of yak casein hydrolysate and the zinc-releasing characteristics of casein hydrolysate-zinc complexes. *J Dairy Scie.* 94(6):2731-2740.
- 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. *J Agri Food Chem.* 54(3):732-738.
- Yamamoto, N., Ejiri, M. y Mizuno, S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.* 9(16):1345-1355.
- Yang, F., Xia, W.-S., Zhang, X.-W., Xu, Y.-S. y Jiang, Q.-X. 2016. A comparison of endogenous and microbial proteolytic activities during fast fermentation of silver carp inoculated with *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem.* 207:86-92.
- Zhang, Y. y Zhou, M. 2019. A critical review of the application of chelating agents to enable Fenton and Fenton-like reactions at high pH values. *J Hazard Mater.* 362:436-450.
- Zhu, K.-X., Wang, X.-P. y Guo, X.-N. 2015. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates. *J Func Food.* 12:23-32.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cereal Science

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jcs>

## Characterization of *Amaranthus hypochondriacus* seed protein fractions, and their antioxidant activity after hydrolysis with lactic acid bacteria

Fabiola Sánchez-López<sup>a</sup>, Víctor J. Robles-Olvera<sup>a</sup>, Madeleine Hidalgo-Morales<sup>a,\*</sup>, Apollinaire Tsopmo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Veracruz-UNIDA, M.A. de Quevedo #2779, Col. Formando Hogar, Veracruz, Veracruz, 91897, Mexico

<sup>b</sup> Food Science and Nutrition Program, Department of Chemistry, Carleton University, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON, K1S 5B6, Canada

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Amaranthus  
Bioactive peptides  
*Lactobacillus*  
Antioxidant activity

### ABSTRACT

The objective of this work was to obtain and characterize five *Amaranthus hypochondriacus* seed protein fractions followed by the determination of antioxidant activities of hydrolysates produced with two *Lactobacillus* species. Molecular weights of polypeptides (SDS-PAGE) in fractions were 14–97 kDa and those identified by LC-MS/MS include agglutinin, trypsin inhibitor, and cystatin. Each fraction was hydrolyzed with *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* at their exponential (4 and 8 h) and stationary (14 and 24 h) growth phases. The free amino group content in hydrolysates produced with *L. helveticus* was up to 5.15% compared to 4.79% in those obtained with *L. plantarum*. In the antioxidant tests, higher ROO• scavenging activities were obtained for hydrolysates from albumins ( $1037 \pm 80 \mu\text{M TE/mL}$ ) and glutelins ( $1793 \pm 168 \mu\text{M TE/mL}$ ) fractions produced with *L. helveticus* and *L. plantarum*, respectively. Scavenging activities of •OH radicals were higher for 11S-G hydrolysates with both *Lactobacillus* at the stationary phase.

### 1. Introduction

Peptides derived from food proteins are increasingly important because of their biological activities and their use as components of functional foods. These peptides are specific fragments of various sizes that have been demonstrated to possess biological functions over and above their expected nutritional value (Chakrabarti et al., 2014). The active peptides are often inactive within the native proteins and must be released by proteolysis most often in vitro with purified enzymes but also by bacterial fermentation. These peptides have amino acid sequences that include a proper mix of hydrophobic, aromatic, or charged residues that are important for their potency (Kamdem and Tsopmo, 2019). Several factors affect the release of bioactive peptides from food proteins including the enzyme used for hydrolysis, proteolytic conditions, and the size of the resulting peptides (Esfandi et al., 2019).

Amaranth is a dicotyledonous plant that belongs to the *Amaranthaceae* family, which has 70 genus and more than 80 species. There are three well-known species *A. hypochondriacus*, native of Mexico, *A. cruentus*, native of Guatemala and Mexico, and *A. caudate*, native of Peru. Amaranth grains are good sources of polysaccharides, lipids,

vitamins, minerals and its proteins content (13%–19%) is higher compared to contents of most cereals. Amaranth proteins have greater nutritional quality because of their high content of lysine and sulfur-containing amino acids, which are limited in traditional cereals and legumes (Montoya-Rodríguez et al., 2015). Like in other grains albumins, glutelins and globulins are the principal seed storage proteins in amaranth. Seed proteins are classified based on either their solubility (e.g. sequential extraction) or their sedimentation coefficient (S) that quantifies the rate at which a protein settles under analytical ultracentrifugation (Shewry et al., 1995). Structurally, based on the sedimentation coefficient, 8S and 13S globulin fractions of amaranth resemble 7S and 11S globulins of other seeds such as pea and are then often referred to as 7S-type and 11S-type (Olguin-Martinez, 1992). Other classifications referred to 7S and 11S globulins as vicilin-like and legumin-like proteins respectively, which are the general name given to similar storage protein fractions from seeds (Segura-Nieto et al., 1992).

There is literature information on the antioxidant activity of hydrolyzed proteins, fractions and peptides in various model systems. This is because antioxidant peptides can play a significant role in the stability of foods but also in biological systems by enhancing resistance to oxidative

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [fabiola-sanz@hotmail.com](mailto:fabiola-sanz@hotmail.com) (F. Sánchez-López), [victor.ro@veracruz.tecnm.mx](mailto:victor.ro@veracruz.tecnm.mx) (V.J. Robles-Olvera), [madeleine.hm@veracruz.tecnm.mx](mailto:madeleine.hm@veracruz.tecnm.mx) (M. Hidalgo-Morales), [apollinaire.tsopmo@carleton.ca](mailto:apollinaire.tsopmo@carleton.ca) (A. Tsopmo).

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103075>

Received 10 June 2020; Received in revised form 7 August 2020; Accepted 7 August 2020

Available online 8 August 2020

0733-5210/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

damage (Kamdem and Troppm, 2019). Health benefits of cereal-based foods are attributed to the presence of soluble fibers but also their ability to maintain the redox balance and to the reduction of the incidence of oxidative stress-related diseases like heart diseases, hypertension and some types of cancer (Chakrabarti et al., 2014). Oxidant molecules in the form of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are continuously formed in the cells and then neutralized by the body's natural antioxidant defense system or by antioxidants consumed as part of the diet or formulated foods. However, there are other factors (e.g. light, toxic, inappropriate nutrition) that cause an excess production of ROS and RNS which can damage biological macromolecules such as DNA, proteins, and lipids and lead to cell aging or the development of chronic diseases (Leung et al., 2018). Food-derived peptides can prevent the oxidation of foods and biological molecules through various mechanisms, including proton and electron transfer, chelation of free transition metals.

Proteins of *A. mangassianus* hydrolyzed under simulated gastrointestinal digestion showed antioxidant activity (Orsini et al., 2011), the albumin fraction of *A. hypochondriacus* hydrolyzed with alcalase showed antioxidant activity and protected human skin cells against UV-induced photo-oxidation (Alejandra-Quintana et al., 2015) while in related works anti-inflammatory and antihypertensive properties were reported in amaranth seed proteins (Montoya-Rodríguez et al., 2015b). Hydrolyzed food proteins have very few side effects and the factors that may affect their antioxidant activity include the specificity of proteases, the degree of hydrolysis, and the structural properties of the resulting peptides (molecular size, hydrophobicity, and amino acid composition) (Chakrabarti et al., 2014; Rafanelli et al., 2019). It is important to mention that, the majority of works on the activity of hydrolyzed proteins or peptides from amaranth species, cereals and pseudocereals has been evaluated *in vitro*, therefore, as mentioned by Morales et al. (2020), future research should consider the use of *in vivo* models to evaluate their efficacy and safety.

Lactic acid fermentation is used in the production of traditional, ethnic, ancient and modern cereal and pseudocereal based foods like sourdough, pasta, beverages and bread. During the process a broad spectrum of volatile compounds, oligosaccharides with prebiotic activity and bioactive peptides are formed (Petrova and Petrov, 2020). Fermentation with lactic acid bacteria was used to obtain protein hydrolysates with antioxidant activity from wheat, spelt, rye and Kamut (Coda et al., 2012). Wheat albumins and globulins were more hydrolyzed by several species of *Lactobacillus* than gliadins (Di Cagno et al., 2002). Meanwhile, to the best of our knowledge, there is no report that evaluates the growth stage of lactic acid bacteria on the release of bioactive peptides from cereals seed storage proteins. It is however known that the growth phase during which bacteria are harvested and consumed can influence their health-promoting functions as documented for example in dairy products (Laakso et al., 2011). Accordingly, the objectives of this work were 1) to fractionate storage proteins from amaranth seeds based on solubility differences and characterize polypeptides by mass spectrometry; 2) to hydrolyze each protein fraction with lactic acid bacteria harvested at various growth stages followed by the determination antioxidant properties of the hydrolysates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Seeds of *A. hypochondriacus* grown organically in the states of Puebla, Oaxaca, and Hidalgo (Mexico) were obtained from Quali group in packages of 250 g. *L. helveticus* NRRL-B-4536 and *L. plantarum* NRRL-B-4496, donated by the Agricultural Research Service-USDA (Department of Agriculture of the United States) were kept refrigerated at 4 °C on MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) agar and reactivated in MRS broth at 37 °C under anaerobic conditions. Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,2'-

Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 1,10-phenanthroline, iron-(II)-sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tris-HCl, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Dithiothreitol (DTT), 4-(2-Pyridylazo) resorcinol (PAR), and zinc sulfate heptahydrate (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) were purchased from Fischer Scientific Co. (Nepean, ON, Canada).

### 2.2. Extraction of proteins and fractionation

Amaranth seeds were milled to obtain a flour of particle size of 80 sieve (<0.177 mm). The flour was defatted with hexane (1:10 w/v) under agitation during 4 h at 4 °C, separated by centrifugation (Eppendorf® Centrifuge 5810R Rotor F-34-6-38) at 18,000g for 20 min at 4 °C and dried at room temperature. The defatted meal was successively (i.e. stepwise) extracted with different extraction solutions to obtain protein fractions according to Silva-Sánchez et al. (2008) protocol. The defatted meal was mixed with the extraction solution (1:10, w/v) under agitation during 1 h at 4 °C, and centrifuged (Eppendorf® Centrifuge 5810R Rotor F-34-6-38) at 18,000g for 15 min at 4 °C to collect the protein fractions (supernatant). The albumin protein fraction was obtained from the defatted meal with distilled water; a solution containing 0.1 M NaCl, 0.010 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.001 M EDTA, pH 7.5 was used to recover 7S globulins. To obtain globulin fraction a solution of 50 mM Tris-HCl containing 0.5 M NaCl (pH 8) was used. The 11S globulins fraction was extracted with the buffer NaCl 0.8 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010 M, EDTA 0.001 M, pH 7.5 and glutelins were extracted with 0.1 M NaOH (Fig. S1 Supplemental material). All supernatants (i.e. protein fractions) were lyophilized and their soluble protein content determined based on a modified Lowry assay (Markwell et al., 1978). Protein samples were stored at -20 °C until use.

### 2.3. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The polypeptide profile of the protein fractions was carried out using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein fractions [5 mg/mL] were mixed with a reducing buffer (pH 6.8) containing 62.5 mM Tris-HCl, 20% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, and bromophenol blue. Polyacrylamide concentrations were 12% for resolving gel and 4% for stacking gel while the running buffer contained 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS. Ten microliters of each protein sample were loaded and allowed to run for 2 h at 13 mA. After electrophoresis, the gels were stained overnight with Coomassie Brilliant Blue R-250 in a final concentration of 0.25%. The destaining was carried out by washing the gel with a 50% methanol + 2% acetic acid solution for 1 h.

### 2.4. Mass spectrometry analysis of protein fractions

Amaranth protein fractions, 1.5 mg protein/mL in 50 mM ammonium bicarbonate solution were denatured at 110 °C for 5 min. The hydrolysis of disulfide bonds and alkylation were performed with DTT (5 mM) and iodoacetamide (10 mM) followed by hydrolysis with trypsin (Sigma T-1426) as previously described by (Walters et al., 2010). Each protein sample was passed through 0.22 µm nylon syringe followed by injection of 0.4 µg. The analysis was performed on a 6550A iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The column was eluted with a linear gradient of 100% solvent A (0.1% HCOOH in water) to 100% solvent B (0.1% HCOOH in acetonitrile) over 30 min. The mass range was 100-1600 m/z and the acquisition rate 2000 transients/spectrum. Gas temperature was set to 125 °C, drying gas rate at 11 L/min and nebulizer at 30 psi. Multiple charge ions (2<sup>+</sup> and 3<sup>+</sup>) between 100 and 1600 m/z were automatically subjected to MS/MS analyses and peaks were processed using Mascot Distiller and Mascot 2.4.1 software (Matrix Science, UK). The BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to identify proteins belonging to

### A. *hypochoericius* in the NCBI non-redundant database.

### 2.5. Hydrolysis of fractions by proteolytic activity of bacteria

#### 2.5.1. Strain preparation

Bacteria strains were reactivated by 3 propagation steps in MRS broth prior to experimental work. Growth was followed by absorbance measurements at 640 nm in MRS broth to identify growth phases. All the cultures were prepared with 1% inoculum and incubated at 37 °C under anaerobic conditions.

#### 2.5.2. Proteolysis conditions

Cells were harvested at 4 periods: the middle of the exponential phase (4 h), the end of the exponential phase (8 h), early stationary phase (14 h), and late stationary phase (24 h); by centrifugation at 6000g for 15 min at 4 °C. The cells were washed with 0.32 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 and re-suspended in a previously standardized (by plate count) volume of the same buffer to obtain  $10^7$  CFU/mL. Proteolysis reaction mixtures were prepared in centrifuge tubes by adding 0.5 mL of bacterial suspension for each 5 mL of protein fraction (5 mg/mL) and incubated at 37 °C under anaerobic conditions. One tube was removed at each incubation time (0, 4, 8, 14, 24 and 48 h) and aliquots (100 µL) were taken to verify the cell viability by counting CFU/mL. The remaining mixture was centrifuged at 6000g for 15 min at 4 °C and the supernatant was stored at -20 °C until testing.

#### 2.5.3. Quantification of the degree of proteolysis

The degree of proteolysis was determined using the trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) procedure. This is based on the reaction of TNBS with the free amine groups of amino acids and small peptides released during hydrolysis to form an orange complex (Freedman and Radka, 1965). Upon thawing, undigested proteins were precipitated with the addition of trichloroacetic acid (TCA, 0.75 N), the samples were filtered and 125 µL of the filtrate were mixed with 2 mL of phosphate buffer (0.5 M, pH 8.2) and 2 mL of 0.1% TNBS, and incubated in the dark at 50 °C for 1 h. The reaction was stopped by addition of 2 mL of 0.1 N HCl followed by cooling and quantification at 340 nm using a standard curve made from glycine (5–100 µM). Hydrolysates with the highest values indicative of higher degree of hydrolysis were selected for further investigation.

### 2.6. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The capacity of the selected protein hydrolysates to scavenge ROO• (i.e. peroxy) radicals was determined using the oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) assay according to literature (Jodayree et al., 2012). The assay measures the extent to which the antioxidant sample protects a fluorescein dye from oxidation by ROO•. Potassium phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) was used to dilute *A. hypochoericius* hydrolysates (50 times) and to prepare the fluorescent probe (fluorescein,  $8.21 \times 10^{-5}$  µM), AAPH (140 mM) and Trolox standards (6.25–100 µM). The analysis was performed as reported based on the prevention of the oxidative decay of fluorescein by AAPH in the presence of the protein hydrolysates. The ROO• scavenging activity reported as ORAC values were calculated using the area under the curve and expressed micromole Trolox equivalents (µM TE/mL).

### 2.7. Hydroxyl radical (HO•) scavenging assay

The assay was performed according to the literature (Vanvi and Trópimo, 2016). Briefly, potassium phosphate buffer (0.75 mM, pH 7.4) was used to make 3 mM of 1, 10-phenanthroline, and to dilute hydrolysates 100 times. Other reagents,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3 mM) and 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  were made in water. Diluted hydrolysates (50 µL) were transferred in triplicates into a clear 96-well plate. Fifty microliters of buffer were used in blank and control wells. Next, 50 µL of phenanthroline were added to

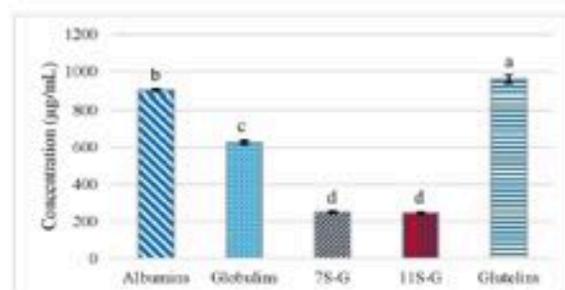


Fig. 1. Soluble protein contents of *A. hypochoericius* seed protein fractions. 7S-G: 7S-globulins, 11S-G: 11S-globulins. The bars represent the mean  $\pm$  SD of two independent experiments with three technical repeats. Bars annotated with the same letter did not differ significantly ( $P < 0.05$ ).

each well followed by addition of 50 µL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to control and samples. In the blank wells, water was added instead of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The plate was sealed with transparent plastic film and incubated for 1 h at 37 °C and 150 rpm. The absorbance was then recorded at 536 nm to calculate the HO• scavenging activity using the following equation:  $[(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}) / (A_{\text{blank}} - A_{\text{control}})] \times 100$ .

### 2.8. Statistical analysis

The experimental results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicates. Statistical analysis was performed using Fisher's F-test and  $p < 0.05$  was regarded as significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Protein extraction and characterization

Proteins were extracted based on their solubility difference, which then allowed their classification into albumins, globulins, 7S-globulins (7S-G), 11S-globulins (11S-G) and glutelins. This classification is in accordance with literature on fractionations of seed storage proteins (Barba de la Rosa et al., 1992; Shewry et al., 1995). Glutelins, albumins, globulins, 7S-G, and 11S-G represented 32.1, 30.1, 21.0, 8.4 and 8.3% of the total amount before fractionation. This is in accordance with the literature that as glutelins and albumins have been reported as major protein fractions of amaranth seeds (Segura-Nieto et al., 1992). The 7S- and 11S-globulins differ by their sedimentation coefficient and can form

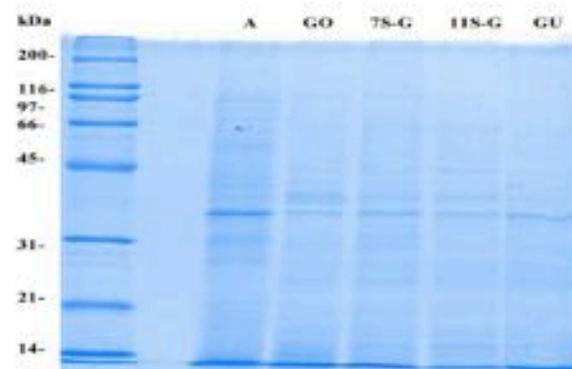


Fig. 2. SDS-PAGE protein profile of *Amaranthus hypochoericius* protein fractions. STD: standard, A: albumins, GO: globulins, 7S-G: 7S-globulins, 11S-G: 11S-globulins, GU: glutelins.

**Table 1**  
Major proteins in *Amaranthus hypochondriacus* protein fractions. Each fraction was trypsin digested before LC-MS/MS analysis. Myoglobin was used as control.

NCBI <sup>a</sup> Protein ID <sup>b</sup>	MW (Da)	Protein name	Score <sup>c</sup>	Fraction
g 4929263 <sup>d</sup> g 20067185	35221	Agglutinin Seed protein AmA1	446	Albumin
g 110748606	27776	Cystatin	96	
g 461598	7998	Trypsin/subtilisin inhibitor	109	
g 122726601	55430	11S globulin	558	
g 4929263 <sup>d</sup> g 20067185 <sup>d</sup>	35221	Agglutinin Seed protein AmA1	165	Globulins
g 461598	7998	Trypsin/subtilisin inhibitor	112	
g 122726601	55430	11S globulin	433	7S-G
g 461598	7998	Trypsin/subtilisin inhibitor	116	
g 4929263 <sup>d</sup> g 20067185 <sup>d</sup>	35221	Agglutinin Seed protein AmA1	86	11S-G
g 122726601	55430	11S globulin	535	
g 461598	7998	Trypsin/subtilisin inhibitor	86	
g 4929263 <sup>d</sup> g 20067185 <sup>d</sup>	35221	Agglutinin Seed protein AmA1	72	
g 1352505	23972	Non-specific lipid-transfer protein	296	Glutelin
g 122726601	57035	11S globulin	293	
g 4929263 <sup>d</sup> g 20067185 <sup>d</sup>	35221	Agglutinin Seed protein AmA1	166	

<sup>a</sup> NCBI<sup>a</sup> Database.

<sup>b</sup> Predicted sequence.

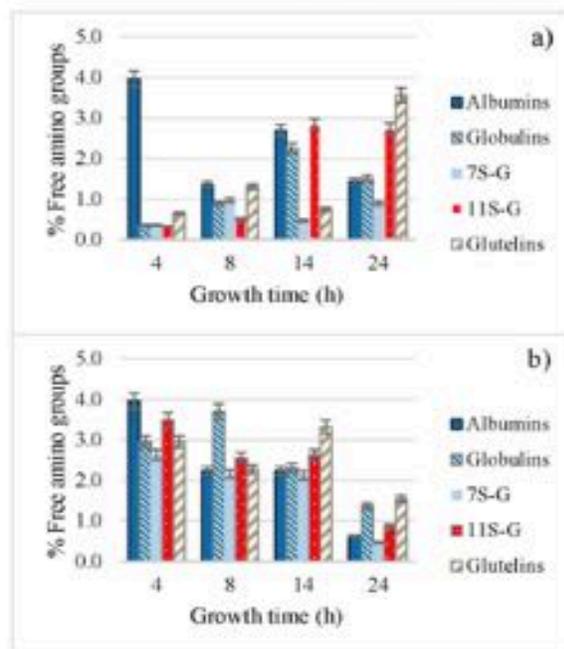
<sup>c</sup> Set match of the same peptides.

<sup>d</sup> MS- BLAST total score.

a trimeric or a hexameric structure (Chevry et al., 1996). The five fractions were characterized by determining their soluble protein contents, polypeptide profiles by gel electrophoresis and polypeptide sequences by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Protein content data (Fig. 1) showed that glutelins had the most amount ( $959.9 \pm 23.5$   $\mu$ g protein/mg) followed closely by the albumins ( $900.6 \pm 6.2$   $\mu$ g protein/mg) while 7S- and 11S globulins had lower content about 250  $\mu$ g protein/mg for both. Overlapping in compositions of fractionated protein fractions is expected as well as some differences. According to literature for example, albumins are rich in tryptophan, threonine, and lysine; globulins in sulfur amino acids and lysine while glutelins have a high content of tryptophan and leucine (Akin Idowu et al., 2013).

The polypeptide composition evaluated by SDS-PAGE (Fig. 2) showed a prominent band of approximately 34 kDa in all fractions, although it was more intense in the albumins fraction. In the glutelin fraction, most bands are thin while some are absent likely. In a previous work, major polypeptide bands of up to 97 kDa were identified in the albumin fraction of *A. hypochondriacus* (Barba de la Roca et al., 1992) contrary to another one that reported MW of 14–55 kDa (Martinez et al., 1997). Major polypeptides of molecular weights 10–94 kDa were reported in sub-fractions of globulins from gel chromatography (Barba de la Roca et al., 1992). It is then evident that chromatographic separation of the protein fractions will provide better resolution and better determination of polypeptide profiles. The identity of most bands in the SDS-PAGE of *A. hypochondriacus* is not known although previous works attributed those at 19–24 and 31–36 kDa to basic and acid subunits of 11S-type proteins (Martinez et al., 1997).

In addition to gel profiling, tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to determine the sequence of proteins in each of the five amaranth protein fractions after trypsin digestion. Main proteins (Table 1) were identified after search in Swiss Protein Data Bank, Protein Data Bank, and GENBank databases. The sequences of peptides used for identification and protein scores are provided in Supplemental



**Fig. 3.** Content of free amino groups after hydrolysis (14 h) of amaranth seed storage protein fractions with a) *Lactobacillus helveticus* and b) *Lactobacillus plantarum* cells at different growth stage. The bars represent the mean  $\pm$  SD of four independent experiments ( $n = 4$ ).

**Table S1.** Proteins identified were 11S globulin, 11S globulin seed storage protein, chain A 11S proglubulin seed storage protein, trypsin inhibitor, agglutinin, seed protein AmA1, and cystatin. Agglutinin and seed protein AmA1 were present in all fractions while cystatin was only in the albumin fraction. The 11S globulin seed storage protein and chain A of 11S proglubulin seed storage protein were solely detected in the glutelins' fraction. The absence of globulin and proglubulin proteins in the albumin fraction demonstrated some effectiveness of the fractionation process. In each fraction 4–5 proteins were identified after LC-MS/MS analysis and this is a rather small number. One possible explanation is the limited number of proteins (fifteen) from the amaranth grain present in the databases (Montoya-Rodriguez et al., 2015) while another one is the relative abundance of proteins as only those with higher amount are detected. Overall, mass spectrometry data showed that the fractions contain different proteins, therefore, it was expected that their hydrolysates will display different biological activities. This was supported by a previous *in silico* digestion data suggesting that most of the proteins identified in this work might contain encrypted peptides with biological activities (Montoya-Rodriguez et al., 2015).

### 3.2. Protein hydrolysis with lactobacillus species

*Lactobacillus* species at four different times of growth, exponential (4, 8 h) and stationary (14, 24 h) phase were used to breakdown polypeptides in each of the five amaranth protein fractions. Lactic acid bacteria proteolytic system comprises a variety of components including extra cellular and cell-wall bound proteinases, and intracellular peptidases that vary in composition and activities according to the species, the growth stage and available nitrogen (Liu et al., 2010). It was therefore expected that hydrolyzed proteins will differ in degree of hydrolysis and hence in polypeptide composition and biological activities.

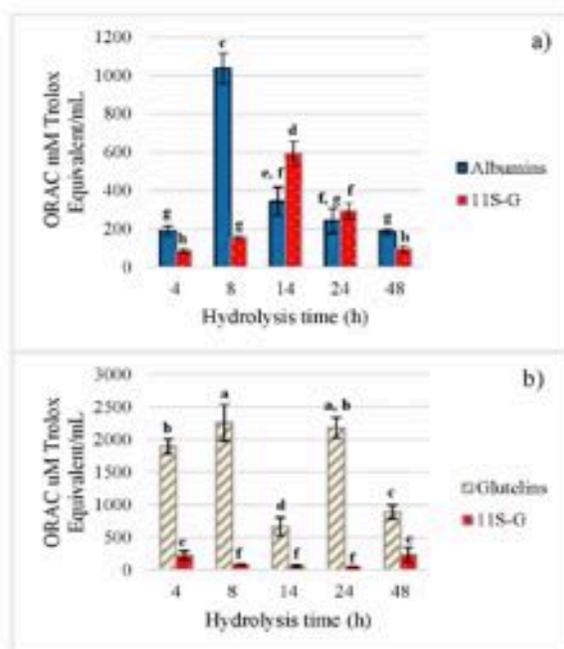


Fig. 4. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values based on  $\mu\text{M}$  Trolox equivalent/mL in a) Albumin and 11S-G hydrolyzed by *Lb. helveticus* and b) Glutelin and 11S-G hydrolyzed by *Lb. plantarum*, all with cells in early stationary phase. The bars represent the mean  $\pm$  SD of four independent experiments ( $n = 4$ ). Different letters show a significant difference between group means ( $P < 0.05$ ).

Data showed that there was a variation in free amino groups content depending on the growth stage, strain of *Lactobacillus* and the incubation time (Supplemental Figures S2–S5). In general, *L. plantarum* (Fig. 3b) showed a greater proteolytic activity over *L. helveticus* (Fig. 3a) for all protein fractions in three (4, 8, 14 h) of the four growth phases. There was a decrease of free amino groups contents for hydrolysates produced with *L. plantarum* cells harvested in their late stationary stage (24 h). Similarly, a previous work reported some *L. plantarum* strains possessed higher proteolytic activities in the early growth stationary phase (Fadda et al., 1998). *L. helveticus* showed an increase in their proteolytic activity as the phase of growth advances (Fig. 3a). Specifically, the free amino acids contents increased from the early exponential phase (4h) to the early stationary phase (14 h) in most of fractions, with the exception of the albumin fraction in which, there was a decrease from 3.99% to 1.4% at the late stationary phase (24 h). The biggest increases due to the action of *L. helveticus* were for globulins and 11S-G fractions when the microorganism was harvested at 14 h (early stationary phase). These data show that proteinases activities were dependent on the growth phase and the nature of proteins present in the fractions.

In this work, it was found that for some protein fractions, an increase of free amino acids content at some growth phase was followed by a decrease at the next phase. Similar behaviors have been reported as illustrated for example, by for milk proteins fermented with *Lactobacillus* species for 24 and 48 h (Gonzalez-Gonzalez et al., 2011). Muscle proteins treated with *L. plantarum* CRL 685 showed an increase in free amino acids concentration after 24 h that reached a maximum at 48 h even though a cellular lysis occurred, maybe because cell-wall-associated proteinase contributed to degradation of proteins (Fadda et al., 1998). Several factors can affect the activity of proteases produced by *Lactobacillus* species and hence the amount of free amino

acids when they are used for the production of protein hydrolysates. The accumulation of peptides containing serine and proline for example, can inhibit the growth of lactic bacteria and hence their proteolytic activity (Niven et al., 1998). Additionally, a decrease in concentration of valine, leucine and isoleucine was reported during the early phase of milk fermentation with *Lactococcus lactis*, but not at later phases (Niven et al., 1998). Another work found higher amount of proline, glutamic acid, and aspartic acid in wheat proteins after fermentation with various *Lactobacillus* species (Di Cagno et al., 2002). It appeared that *Lactobacillus* species have proteolytic activity towards food proteins and that they can use at different extend some of released peptides and amino acids, like valine and leucine by *Lactococcus lactis* (Niven et al., 1998), for their own growth. Any of these factors may have affected the amount of free amino acid found in hydrolyzed *A. hypochondriacus* protein fractions.

Studies have reported the correlation between the contents of free amino groups (i.e. degree of hydrolysis) of food proteins and their biological activities (Estefandi et al., 2019). Two of the seed storage protein fractions (albumin and 11S-G) hydrolyzed by *L. helveticus* and two others (glutelin and 11S-G) hydrolyzed by *L. plantarum* with higher contents of free amino groups, were consequently selected for further evaluation.

### 3.3. Peroxyl radical scavenging activity of hydrolyzed protein fractions

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC), a standard assay based on the inhibition of peroxyl radicals ( $\text{ROO}^\bullet$ )-induced oxidation of a fluorescent probe was used to assess the  $\text{ROO}^\bullet$  scavenging power of four *A. hypochondriacus* protein fractions with the higher concentration of amino groups after hydrolysis with *Lactobacillus* species. The results (Fig. 4) were expressed as  $\mu\text{M}$  Trolox equivalents (TE)/mL of the hydrolysate. During the early time of hydrolysis (4 h) with *L. helveticus*, the activity of the albumin fraction (i.e. hydrolysate) was  $191 \pm 24 \mu\text{M TE/mL}$ . An increase of 4.5-fold was found at 8 h (Fig. 4a), indicating that polypeptides present at this time contained amino acid residues properly positioned to donate hydrogen to the  $\text{ROO}^\bullet$  and slow down the decay of fluorescein. Further incubation resulted in a gradual and significant decrease of the scavenging power of the albumin fraction. During the hydrolysis with *L. helveticus* (Fig. 4a), in the 11S-globulin (11S-G) fraction hydrolysates the maximum activity ( $594 \pm 65 \mu\text{M TE/mL}$ ) was observed at 14 h of hydrolysis time and the activity in 11S-G was lower than in the albumin fraction. Amongst the hydrolysates, those obtained from glutelin upon hydrolysis with *L. plantarum* were the most scavengers of  $\text{ROO}^\bullet$  radicals with ORAC values between  $2179 \pm 157$  and  $2264 \pm 280 \mu\text{M TE/mL}$  (Fig. 4b). The 11S-G fraction showed different behavior depending on the bacteria species. In the presence of *L. helveticus*, the  $\text{ROO}^\bullet$  activity of 11S-G hydrolysates increased with incubation time from 4 to 14 h followed by gradual decreased at 24 and 48 h. Meanwhile, in the presence of *L. plantarum* the activity was low at all hydrolysis time points. Based on these data, it can be concluded that the differences observed may be due to the fact that the two *Lactobacillus* species did not possess identical proteases and hence the difference in scavenging power of the 11S-G hydrolysates. The difference might be explained by the fact that *Lactobacillus* species differently used some of the released amino acids and peptides for their proper growth (Liu et al., 2010). Other factors that affect radical scavenging activities of peptides include bond dissociation energy, ionization hydrophobicity and size (Leung et al., 2010). Such factors although not determined as part of this work might have had a contribution.

### 3.4. Hydroxyl radical scavenging activity

The hydroxyl radical ( $\text{HO}^\bullet$ ), one of the most reactive free radicals, was generated by the reaction ferrous ( $\text{Fe II}$ ) iron and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . It oxidized lipids, polypeptides, proteins, and DNA (Aderinola et al., 2018). The scavenging abilities of amaranth hydrolysates on  $\text{HO}^\bullet$  radical percentage inhibition is shown in Fig. 5. The highest values were associated

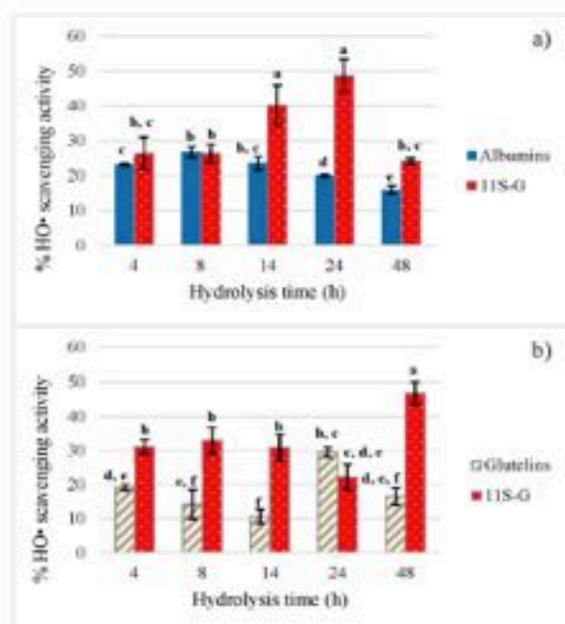


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activity of a) Albumin and 11S-G hydrolysates generated by *L. helveticus* and b) Glutelins and 11S-G hydrolysates generated by *L. plantarum*, all with cells in early stationary phase. The bars represent the mean  $\pm$  SD of four independent experiments ( $n = 4$ ). Different letters show the significant difference between group means ( $P < 0.05$ ).

with *L. helveticus* 11S-G hydrolysates (Fig. 5a) at 14 h ( $40.2\% \pm 5.7\%$ ) and 24 h ( $48.7\% \pm 4.7\%$ ), and with the *L. plantarum* 11S-G hydrolysate (Fig. 5b) at 48 h ( $46.9\% \pm 3.3\%$ ) of hydrolysis. Glutelin hydrolysates had the lowest HO• activities and there was a gradual decrease with the incubation time. All 11S-G hydrolysates showed good HO• scavenging activities and contrary to ROO• data, longer incubation times resulted in higher activities. 11S-G hydrolysates with minimal ROO• scavenging power displayed relatively good HO• activities (up to 46.9%). This is likely because the HO• activity is dependent on both proton donation and Fe(II) chelating power while the ROO• activity relies on electron or proton donating groups (Esfandi et al., 2019). Some studies have reported that polar amino acids such as aspartic acid, glutamic acid, serine, cysteine, and histidine may have enhanced HO• activity (Vanvi and Tsopmo, 2016). Depending on the *Lactobacillus* species, fermentation enhanced the HO• activity of 11S-globulins but decreased that of the glutelins. This is in agreement with the literature as there are no consistent patterns. In some case, larger peptides have higher activity because of the capacity to easily chelate Fe (II) while in certain cases, the capacity of shorter peptides to donate a proton to the radical predominates (Esfandi et al., 2019).

The antioxidant activity of amaranth protein fractions or hydrolyzed proteins has been reported in other works. In this regard, protein fractions and alcalase hydrolysates have displayed activities via the prevention of linoleic acid oxidation, the reduction of ferric ions, or the scavenging of ABTS and DPPH radicals (Tironi and Abdo, 2010; Alcántara-Quintana et al., 2015). The ABTS scavenging activity was reported for hydrolyzed amaranth proteins produced under simulated gastrointestinal conditions (Orsini et al., 2011). In addition to the use of purified enzyme, lactic acid bacteria specifically casei and thermophilus species were used to ferment amaranth proteins and produced hydrolysates with not only antioxidant but also antihypertensive and antithrombotic properties (Ayala-Ninó et al., 2019). The activity is dependent

on the protease and the microorganism. Additionally, the present work reported a variation based on the growth stage of the microorganism.

#### 4. Conclusion

Tandem mass spectrometric analysis showed that *A. hypochondriacus* protein fractions had different polypeptide compositions demonstrating the efficiency of the process. Fractions hydrolyzed with *L. plantarum* at stationary phase showed greater proteolysis degree than those hydrolyzed with *L. helveticus*. Albumin and glutelin hydrolysates possessed higher free radical scavenging activities. Further studies that involve the purification of peptides and their in vivo assays are needed to determine their contribution in human health and potential application in functional foods.

#### CRediT authorship contribution statement

Fabiola Sánchez-López: Investigation, Methodology, Writing-Original draft preparation. Victor J. Robles-Olvera: Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. Madeleine Hidalgo-Morales: Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Writing - review & editing. Apollinaire Tsopmo: Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Writing - review & editing.

#### Declaration of competing interest

There is no conflict of interest to be declared by the authors.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Tecnológico Nacional de México (Grant No. TecNM-5941.16-P). Sánchez-López was supported with a postgraduate scholarship as well as an international mobility scholarship (No: ISSSTE2019-1/2019-000032-01EXTF) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, México. Additional support was received from the National Science and Engineering Research Council of Canada (Grant No. 371908).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103075>.

#### References

- Aderinola, T.A., Fagbeni, T.N., Enajiga, V.N., Alabi, A.M., Aluko, R.E., 2018. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon* 4, e00877. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.06.007>.
- Akin Adewu, F.E., Odunola, G.A., Gbadegesin, M.A., Oka, A., Oriphe, U., 2018. Assessment of the protein quality of twenty nine grain amaranth (*Amaranthus* spp. L.) accessions using amino acid analysis and one-dimensional electrophoresis.  *Afr. J. Biotechnol.* 17, 1802–1810. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2971>.
- Alcántara-Quintana, L.E., Ortiz-Hernández, A., Rivera, M., del, P., Soriano-Santos, J., 2015. The antioxidant activity of peptides isolated from *Amaranthus* on normal human skin in vitro and inflammatory cytokines detection. *J. Nutr. Food Sci.* 5 <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000419>.
- Ayala-Ninó, A., Rodríguez-Serrano, G.M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Avilá, M., Sánchez-Franco, J.A., González-Olivares, L.G., Cepeda-Saiz, A., 2019. Bioactivity of peptides released during lactic fermentation of amaranth protein with potential cardiovascular protective effect: an in vitro study. *J. Med. Food* 22, 976–981. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0036>.
- Barbe de la Rosa, A.P., Gueguz, J., Fuentes-López, O., Viroben, G., 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 40, 931–936. <https://doi.org/10.1021/jf00016a002>.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J., 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *Biomol. Res.* 10, 608979. <https://doi.org/10.1155/2014/608979>.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobberti, M., 2012. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1087–1096. <https://doi.org/10.1128/AEM.66837-11>.

- Di Cagno, R., De Angelis, M., Laverriero, P., De Visentini, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobetti, M., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 623–633. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.623-633.2002>.
- Efendi, K., Walters, M.E., Tuopio, A., 2019. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon* 5, e01538. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01538>.
- Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P.R., Oliver, G., 1998. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00997-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00997-3).
- Freedman, R.B., Radde, G.K., 1968. The reaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, Peptides and proteins. *Biochem. J.* 108, 389–391. <https://doi.org/10.1042/bj1080389>.
- Gonzalez-Gonzalez, C.R., Tuohy, K.M., Jauregi, F., 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. *Int. Dairy J.* 21, 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.001>.
- Jodarys, S., Smith, J.C., Tuopio, A., 2012. Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. *Food Res. Int.* 46, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.004>.
- Kandem, J.P., Tuopio, A., 2019. Reactivity of peptides within the food matrix. *J. Food Biochem.* 43, e12489. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12489>.
- Laakso, K., Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salazar, T., Aavitsen, P., Savijoki, E., Nyman, T.A., Kalkkainen, N., Tynkkynen, S., Varmann, P., 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. *Microb. Biotechnol.* 4, 746–766. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00275.x>.
- Leung, R., Venut, C., Zeng, T., Tuopio, A., 2018. Structure-function relationships of hydroxyl radical scavenging and chromium-VI reducing cysteine-tripeptides derived from rye scallin. *Food Chem.* 254, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.190>.
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Rencocks, B., Nauta, A., Stenzen, R.J., 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genom.* 11, 5–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9).
- Martinez, E.N., Castellani, O.F., Abi6, M.C., 1997. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3802–3809. <https://doi.org/10.1021/jf9700384>.
- Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M.A., Reyes-Morales, C., Milán-Carrillo, J., González de Mejía, E., 2015. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 139–158. <https://doi.org/10.1111/1541-4307.12125>.
- Morales, D., Miguel, M., García-Rimón, M., 2020. Pseudocereals: a novel source of biologically active peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8398. <https://doi.org/10.1080/10408098.2020.1761774>.
- Niven, G.W., Knight, D.J., Milholland, F., 1998. Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *J. Dairy Res.* 65, 101–107. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002632>.
- Olguin-Martinez, L.E., 1992. Characterization of Globulins from Amaranth Seeds (*Amaranthus Hypochondriacus*, L.). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Mexico, D.F., Mexico.
- Ortíz, D.M.C., Tiróni, V.A., Cristina Anon, M., 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)* 44, 1752–1760. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.002>.
- Petrova, P., Petrov, K., 2020. Lactic acid fermentation of cereals and pseudocereals: ancient nutritional biotechnologies with modern applications. *Nutrients* 12, 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu12041118>.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Yelancuez, H., Olguin-Martinez, L.E., Rodríguez-Nester, C.E., Herrera-Estrella, L., 1992. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1553–1558. <https://doi.org/10.1021/jf00021a016>.
- Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S., 1995. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 7, 945–956. <https://doi.org/10.1105/pc.7.7.945>.
- Tiróni, V.A., Abi6, M.C., 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis. *Food Res. Int.* 43, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.001>.
- Vazvi, A., Tuopio, A., 2016. Pepsin digested oat bran proteins: separation, antioxidant activity, and identification of new peptides. *J. Chem.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/9216378>, 2016.
- Walters, M.E., Udenigwe, C.C., Tuopio, A., 2018. Structural characterization and functional properties of proteins from oat milling fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 95, 991–1000. <https://doi.org/10.1002/sooc.12101>.

## CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS Y NO PLAGIO

En la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los 03 días del mes marzo de 2021.  
El que suscribe Fabiola Sánchez López por mi propio derecho y en calidad  
de autor de la tesis  
titulada: Identificación de péptidos bioactivos en fracciones proteicas  
de *Aeromonas hydrophila* hidrolizadas por bacterias  
ácido láctico.  
(en lo sucesivo la "TESIS")  
manifiesto que cedo a título gratuito la totalidad de los derechos patrimoniales  
de autor que sobre ella me corresponden, a favor del Tecnológico Nacional de México  
(en lo sucesivo el "TecNM"). Lo anterior en términos de los antecedentes y  
consideraciones siguientes:

- I. Que la presente cesión de derechos de la "TESIS" se transfiera en virtud de lo estipulado en los establecido en los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, sin reservarme acción legal de ningún tipo.
- II. Manifiesto bajo protesta de decir verdad, que la "TESIS" es original, inédita y propia, no existiendo impedimento de ninguna naturaleza para la cesión de derechos que se está haciendo, respondiendo además por cualquier acción de reivindicación, plagio u otra clase de reclamación que al respecto pudiera sobrevenir.
- III. Que la titularidad de derechos de autor de la "TESIS" en términos del artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor (reproducción, en todas sus modalidades, transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de explotación que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer, son propiedad única y exclusiva del "TecNM", adquiriendo el derecho de reproducción en todas sus modalidades, el derecho de transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de uso que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer. La cesión de derechos se realiza con carácter permanente e irrevocable.
- IV. El TecNM podrá exhibir la "TESIS" a través de cualquier medio, en cualquier parte del mundo, incluso ser modificada, comprendida, traducida y de cualquier forma explotada en su totalidad o parcialidad.
- V. Que no he otorgado, ni otorgaré por ningún motivo, consentimiento alguno para la utilización de la "TESIS" por cualquier medio y su materialización en productos o servicios de cualquier naturaleza, a favor de ninguna persona física o moral, distinta a el "TecNM".
- VI. Estoy enterado del contenido y alcance legal de la presente cesión de derechos, firmando al final del presente documento para su certificación.

Señalo como correo electrónico para recibir futuras notificaciones:  
fabio12152m3@nctmail.com



EL AUTOR