

Potencial biológico de péptidos obtenidos del amaranto mediante fermentación con bacterias ácido lácticas

Dora Elisa Cruz-Casas, Cristóbal N. Aguilar, Juan A. Ascacio-Valdés, Raúl Rodríguez-Herrera, Mónica L. Chávez-González, Adriana C. Flores-Gallegos*

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés s/n Col. República 25280 Saltillo, Coahuila, México.

*carolinaflores@uadec.edu.mx

Resumen

La fermentación es una estrategia para obtener péptidos bioactivos que ha sido poco explorada en el amaranto. En este trabajo, se utilizaron 123 cepas aisladas de leche de cabra, aguamiel, brócoli y amaranto. Se determinó el porcentaje total de degradación de proteínas del amaranto (%TPD) demostrado por las cepas. Los resultados oscilaron entre 0 y 95.95% y se seleccionaron e identificaron las cepas que produjeron un mayor %TPD, las cuales correspondían a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Bacillus*. La fermentación semisólida se realizó con dichas cepas y se procedió a obtener los extractos de agua/sal (WSE) que contenían los péptidos liberados. Mediante la técnica Tricine SDS-PAGE se lograron visualizar bandas de entre 26.6 y 1.4 kD; la concentración de péptidos se midió por el método OPA y se evaluó la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana de los WSE. En el ensayo FRAP, el mejor WSE fue LR9 con una concentración de $1.99 \mu\text{MTE/L} \pm 0.07$, mientras que en ABTS, 18C6 obtuvo la mayor concentración con $19.18 \mu\text{MTE/L} \pm 0.96$. En cuanto a la actividad antihipertensiva, se obtuvieron porcentajes de inhibición entre 0 y 80.65%. También se comprobó que algunos WSE tienen propiedades antimicrobianas contra *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*. Al realizar la ultrafiltración con membranas de 10 y 3 kD de los WSE seleccionados, se determinó que las fracciones > 10 kD y 3 – 10 kD resultaban tener mejor actividad antioxidante y antimicrobiana. Por lo tanto, la fermentación del amaranto con BAL permitió la liberación de péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana.

Palabras Claves: Péptidos bioactivos, fermentación, bacterias ácido lácticas, potencial bioactivo, amaranto

Abstract

Fermentation is a strategy to obtain bioactive peptides that has been little explored in amaranth. In this work, 123 strains isolated from goat milk, mead, broccoli and amaranth were used. The total percentage of amaranth protein degradation (%TPD) demonstrated by the strains was determined. The results ranged from 0 to 95.95% and the strains that produced a higher %TPD were selected and identified, which corresponded to the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Bacillus*. Semi-solid fermentation was carried out with these strains and the water/salt extracts (WSE) containing the released peptides were obtained. Using the Tricine SDS-PAGE technique, bands between 26.6 and 1.4 kD were visualized; the peptide concentration was measured by the OPA method and the antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activity of the WSEs was evaluated. In the FRAP assay, the best WSE was LR9 with a concentration of $1.99 \mu\text{MTE/L} \pm 0.07$, while in ABTS, 18C6 obtained the highest concentration with $19.18 \mu\text{MTE/L} \pm 0.96$. Regarding antihypertensive activity, inhibition percentages between 0 and 80.65% were obtained. Some WSE were also found to have antimicrobial properties against *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. Upon ultrafiltration with 10 and 3 kD membranes of the selected WSEs, it was determined that the fractions > 10 kD and 3 - 10 kD were found to have better antioxidant and antimicrobial activity. Therefore, amaranth fermentation with BAL allowed the release of peptides with antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activity.

Key Words: Bioactive peptides, fermentation, lactic acid bacteria, bioactive potential, amaranth

Nota: Parte de los resultados de este artículo han sido publicados en revistas científicas (Cruz-Casas et al., 2021, 2023) ponencias y carteles de congresos.

Introducción

En la actualidad muchas enfermedades afectan a la calidad de vida de las personas, por ejemplo, el cáncer, los trastornos inmunitarios o las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2018). Aunque ya existen tratamientos para estas afecciones, es común que produzcan efectos secundarios adversos (Udenigwe et al., 2021) por lo que se busca encontrar alternativas que no sean perjudiciales para la salud del consumidor y que puedan tratar o prevenir la enfermedad. Los péptidos bioactivos son moléculas capaces de tener efectos benéficos para la salud del consumidor, porque se asocian a diversas bioactividades, como la antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva, antimicrobiana e inmunomoduladora (Ulug et al., 2021). Están compuestos por 2 a 20 residuos de aminoácidos y tienen un peso molecular inferior a 6 kD (Domínguez-Pérez et al., 2020). Estas características les permiten mantener una alta especificidad y baja toxicidad, lo que las convierte en moléculas farmacológicamente atractivas (Datta & Roy, 2021).

Los péptidos bioactivos pueden obtenerse a partir de proteínas alimentarias tanto animales como vegetales, aunque en los últimos años ha aumentado la preferencia por las fuentes vegetales (Rizzello et al., 2017). En México, existe una gran variedad de alimentos de origen vegetal ricos en proteínas, por ejemplo, el amaranto. De acuerdo con el SIAP (2018) se producen 6,804 toneladas de amaranto y se consumen 4.5 g per cápita. Se ha demostrado que es un alimento con múltiples beneficios, a partir del cual se pueden producir péptidos bioactivos debido a que tiene una alta concentración proteica de entre 13.2 y 18.4% y está compuesto por aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (Oronata-mayo et al., 2018; Singh et al., 2019).

Un factor importante durante la producción de péptidos bioactivos es el método de liberación ya que estas moléculas se encuentran codificadas e inactivas en la proteína parental, por lo que es necesario escindir la proteína (Daliri et al., 2017). El método seleccionado influye en la secuencia de aminoácidos del péptido obtenido, por lo tanto, también influye en su bioactividad; los métodos más utilizados

son la hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana (Ulug et al., 2021).

La hidrólisis enzimática es un método ampliamente utilizado en la producción de péptidos bioactivos del amaranto, con este método se han obtenido péptidos con actividad antihipertensiva, antidiabética, antioxidante, antitrombótica, anticancerígena, inmunomoduladora, entre otras actividades biológicas (Montoya-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, también es importante analizar los péptidos que se pueden generar mediante otras estrategias como la fermentación microbiana ya que este método tiene ciertas ventajas sobre la hidrólisis enzimática como, la diversidad de proteasas microbianas y los altos niveles de actividad proteasa que poseen algunos microorganismos como las bacterias ácido lácticas (BAL), así como bajos costos de producción (Leblanc & Perdigon, 2002). Además, se pueden obtener péptidos con secuencias de aminoácidos no reportadas y potenciales actividades biológicas.

El objetivo de este trabajo fue obtener péptidos bioactivos del amaranto por fermentación con BAL y caracterizar sus actividades biológicas.

Materiales y Métodos

La metodología se realizó en tres etapas experimentales en donde se llevaron a cabo las actividades correspondientes.

Etapa 1: Liberación de péptidos de amaranto mediante fermentación con BAL

a) Análisis proximal del amaranto

Se compró el grano de amaranto en una tienda de la localidad de Saltillo, Coahuila, México. Fue molido y tamizado hasta obtener una harina. Se determinó la proteína, lípidos, humedad, fibra total y cenizas mediante los métodos establecidos de la AACC (46-11th, 30-10.01, 08-01 y 44-15th) y AOAC 962.09. Los carbohidratos se determinaron por diferencia.

b) Determinación de la degradación de la proteína total

Se reactivaron 123 cepas, las cuales fueron previamente aisladas de la leche de cabra, brócoli, aguamiel y harina de amaranto. Se

realizo un caldo de amaranto-maltosa, en el cual se inocularon dichas cepas. Se utilizaron las condiciones descritas por Pepe et al., (2003). La degradación de proteína total (TPD) se determinó utilizando el método de Bradford. Siguiendo la fórmula descrita por Cruz-Casas et al., (2023).

c) Identificación molecular de las cepas

Las cepas que demostraron tener mayor porcentaje de degradación de la proteína total del amaranto de acuerdo con el análisis estadístico realizado fueron identificadas. Para esto se realizó una extracción del ADN. Utilizando los primers 27f y 1512R se amplificó el ARNr 16S. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 %. Utilizando la base de datos NCBI con el algoritmo BLAST se llevó a cabo la identificación molecular.

d) Fermentación semisólida del amaranto

Las células de las cepas seleccionadas fueron recuperadas y lavadas. Se añadió la concentración establecida por Cruz-Casas et al., (2023) a 30 g de amaranto con 70 mL de agua. La fermentación se realizó en reactores de charolas de aluminio por 24 h a 37 °C. Se tomaron controles a las 0 h y 24 h. Se prepararon extractos agua/sales (WSE) a partir de los productos de fermentación utilizando la metodología descrita por Rizzello et al., (2017).

Etapa 2: Determinación de la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana de péptidos de amaranto

a) Concentración peptídica

La concentración peptídica se determinó por el método de o-ftaldialdehído (OPA) (Church et al., 1983) con algunas modificaciones realizadas por Muhialdin et al., (2020). Se empleó una curva de triptona como referencia.

b) Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio de los métodos de ABTS, FRAP y DPPH usando la curva de calibración correspondiente (Delgado-Andrade et al., 2005).

c) Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se realizó mediante una técnica colorimétrica utilizando el

kit-WST ACE (Dojindo, Japan). De acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

d) Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método descrito por Avaiyarasi et al., (2016) y modificado por (Venegas-Ortega et al., 2020). Se evaluó la actividad antimicrobiana de los WSE en contra de las bacterias patógenas de *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

Etapa 3: Caracterización de los péptidos de amaranto

a) Electroforesis

La electroforesis se realizó mediante la técnica de Tricine-SDS-PAGE (Haider et al., 2011). El peso molecular se determinó utilizando el marcador Page-Ruler® (Thermo Scientific™) (3,4-100 kD).

b) Purificación de péptidos

Los WSE se fraccionaron mediante ultrafiltración utilizando dos tamaños de membrana: 30 y 10 kD. A los productos obtenidos se les evaluó nuevamente la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todas las pruebas se realizó mediante un ANOVA de una vía; la comparación por pares de las medias mediante Tukey $P < 0.05$ utilizando el programa estadístico Statistica (Statistica7.0 para Windows).

Resultados

Análisis proximal del amaranto

La composición proximal de la harina de amaranto utilizada en este estudio fue la siguiente: lípidos 7.08 ± 0.2 (%), proteína 15.3 ± 0.4 (%), ceniza 2.90 ± 0.1 (%), fibra total 1.05 ± 0.1 (%), humedad 8.61 ± 0.4 (%) y carbohidratos 65.06 ± 0.9 (%). Estos valores coinciden con los reportados por Rodríguez et al., (2020), excepto la fibra total. Esto puede ser debido a la variedad de amaranto utilizado y a las condiciones ambientales de crecimiento (D'Amico & Schoenlechner, 2017).

Determinación de la degradación de la proteína total

Se evaluó el porcentaje de TPD de las 123 cepas previamente aisladas de la leche de cabra, brócoli, aguamiel y harina de amaranto. Se obtuvo un %TPD de entre el 0% y el 95.95%, del total de cepas evaluadas, como se muestra en la figura 1. Estos valores son similares a lo encontrado en otros reportes, por ejemplo, Valerio et al., (2020) obtuvo un %TPD del 73.7%. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo un %TPD máximo de 95.95 ± 5.73 , lo cual es superior a lo obtenido por Valerio et al., (2020); esto es debido a la diferencia de cepas utilizadas.

Las cepas con mayor porcentaje de TPD de acuerdo con el estadístico realizado resultaron ser: LS15, LS19, LR9, 4A4, 3A2, 2M2, AE13, AE7, 9C4, 11C4 y 18C6 (Figuras 1A, 1B, 1C y 1D). Estas cepas fueron seleccionadas para los análisis posteriores puesto que lograron degradar eficazmente la proteína de amaranto encontrada en el caldo amaranto-maltosa, por lo que se puede asumir que estas cepas tienen las enzimas necesarias para poder liberar a los péptidos bioactivos encriptados en la proteína parental de amaranto.

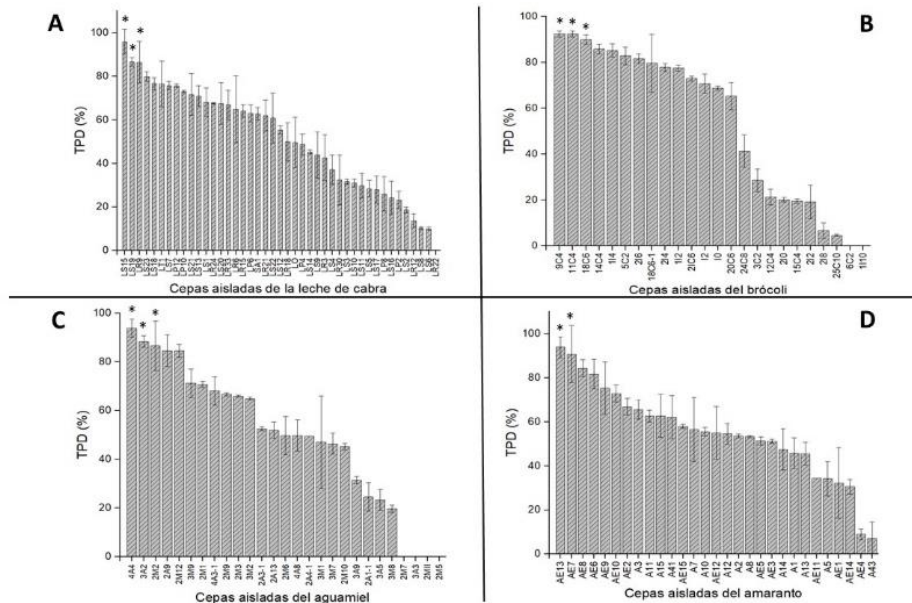


Figura 1. Degradación de la proteína total del amaranto (TPD) por la acción de cepas aisladas de: A) leche de cabra, B) brócoli, C) aguamiel y D) amaranto. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Identificación molecular de las cepas

Las cepas LS15, 9C4 y LR9 se identificaron como *Enterococcus faecium*, dichas cepas fueron aisladas de la leche de cabra y el brócoli. La cepa LS19 aislada de la leche de cabra correspondió a *Enterococcus durans*. Mientras la cepa AE13 aislada de la harina de amaranto se identificó como *Enterococcus casseliflavus*. La cepa 11C4 aislada del brócoli correspondió a *Lactiplatibacillus plantarum*. Las cepas AE7 y 18C6 se identificaron como *Leuconostoc mesenteroides*, estas fueron aisladas de la harina de amaranto y del brócoli. Las cepas 4A4, 3A2 y 2M2 pertenecen al género *Bacillus*. Identificándolos como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus proteolyticus* y *Bacillus megaterium* respectivamente. Este género no es una BAL pero también fue analizado con el objetivo de realizar comparaciones con las BAL.

Los géneros de *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactiplatibacillus plantarum* son reconocidos por liberar péptidos bioactivos en varias proteínas (Algboory & Muhiaddin, 2021; Gútez et al., 2013; Mhina et al., 2020). Hasta el momento, no se habían utilizado para la obtención de péptidos del amaranto. En cuanto a *Leuconostoc mesenteroides* es una BAL con una actividad proteolítica pobre (Ballesteros et al., 2006); sin embargo, en este trabajo se encontró que tiene una alta degradación de la proteína de amaranto. Así mismo, no hay reportes de su uso para la liberación de péptidos bioactivos del amaranto.

Concentración peptídica

Se obtuvieron concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1.74 y 1.52 mg/mL a partir de las WSE evaluadas. Existe variación en la

concentración de péptidos de las diferentes WSE, incluso de los WSE producidos con la misma especie de BAL. Esto se debe a que las enzimas proteolíticas de cada especie de BAL son muy variables a nivel inter e intraespecífico, principalmente para los genes que codifican las proteinasas de la envoltura celular (CEP) que son las encargadas de hidrolizar a la proteína (Alcántara et al., 2016).

La fermentación semisólida utilizada en este trabajo generó concentraciones de péptidos similares a las reportadas por Ayala-Niño et al., (2019), quien evaluó péptidos de amaranto generados por fermentación con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los 11 WSE evaluados se muestran en la figura 2. En la prueba de DPPH (figura 1B) no se observaron diferencias significativas entre los WSE, pero la mayoría de los WSE obtuvieron una mayor concentración en comparación al control a las 0 h, excepto por el WSE AE7. Esto puede ser debido a que este WSE no contiene la secuencia de aminoácidos (hidrófobos y aromáticos) adecuados para demostrar esta

bioactividad (Udenigwe et al., 2021). Esto también se confirma con las pruebas de ABTS y FRAP realizadas.

En la prueba de ABTS el mejor WSE fue 18C6 como se observa en la figura 1A. Por lo que este extracto puede contener aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, los cuales son donantes de electrones o átomos de hidrogeno, que se encargan de capturar radicales libres (Park et al., 2020). Los resultados obtenidos son superiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019), quien fermenta el amaranto para la obtención de péptidos bioactivos, pero utiliza otras BAL: *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

El WSE LR9 fue el mejor en la prueba de FRAP como se muestra en la figura 1C. Se obtuvieron concentraciones inferiores en comparación con la prueba de ABTS, esto debido a que FRAP es realizado a pH ácidos, provocando el aumento del potencial redox y que los valores disminuyan (Prior et al., 2005). Los resultados obtenidos son inferiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019), esto debido a la diferencia de cepas utilizadas.

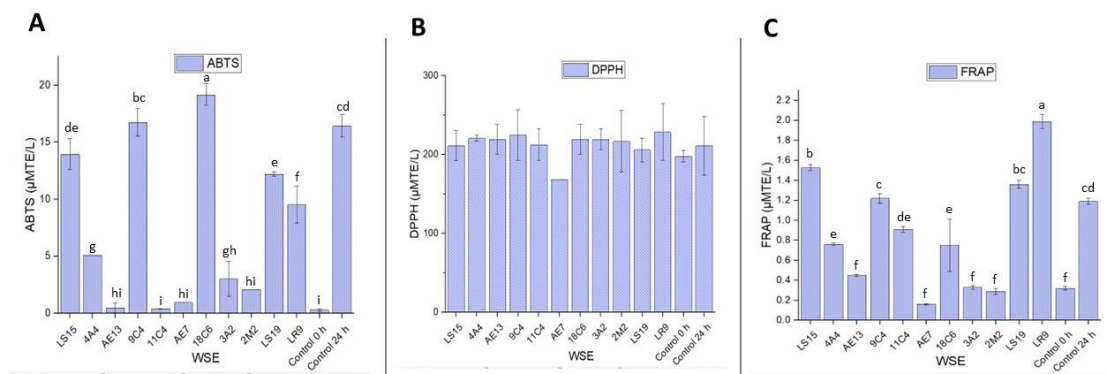


Figura 2. Actividad antioxidante de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto, mediante las pruebas de: A) ABTS, B) DPPH y C) FRAP. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva de los WSE se muestra en la tabla 1. Los valores obtenidos fueron de entre 56.76 y 80.67 % y no hubo diferencias significativas entre los WSE. Los péptidos bioactivos que contienen los WSE evaluados pueden tener esta bioactividad al unirse de forma competitiva o no al sitio activo de la ECA-I (Chai et al., 2020). Los porcentajes de inhibición de la ECA-I más bajos fueron los obtenidos por los controles a

las 0 h y a las 24 h. Los WSE AE7 y 11C9 no mostraron inhibir a la ECA-I. Estos resultados son superiores a lo reportado por Ayala-Niño et al., (2019). Puesto que este autor obtiene porcentajes de inhibición de la ECA-I de entre 36.14 y 45.22 %, lo cual puede deberse a la diferencia de cepas utilizadas para fermentar el amaranto.

Tabla 1. Actividad antihipertensiva de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto

WSE	Actividad inhibitoria de la ECA-I (%)
LS15	78.99 ± 8.32 ^a
4A4	78.99 ± 13.07 ^a
AE13	66.81 ± 1.78 ^a
9C4	64.71 ± 14.26 ^a
18C6	59.24 ± 8.91 ^a
3A2	80.67 ± 2.38 ^a
2M2	80.25 ± 2.97 ^a
LS19	69.33 ± 24.36 ^a
LR9	77.73 ± 1.78 ^a
Control 0 h	56.76 ± 8.11 ^b
Control 24 h	58.40 ± 5.46 ^b

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Actividad antimicrobiana

Algunos WSE demostraron tener actividad antimicrobiana en contra de *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes* como se muestra en la figura 3A y 3B respectivamente; esta bioactividad podría relacionarse con la secuencia de aminoácidos de los péptidos generados por lo que no todos los extractos demostraron el efecto. Los péptidos deben tener aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos

para demostrar tener actividad antimicrobiana, ya que esto les permite permeabilizar la membrana, dirigirse a la pared celular extra e intracelular e inducir la apoptosis (Datta & Roy, 2021). Estos resultados son superiores a lo reportado por Banihashemi et al., (2020), aunque ellos estudiaron péptidos del queso Koopeh fermentado con las BAL autóctonas de este alimento.

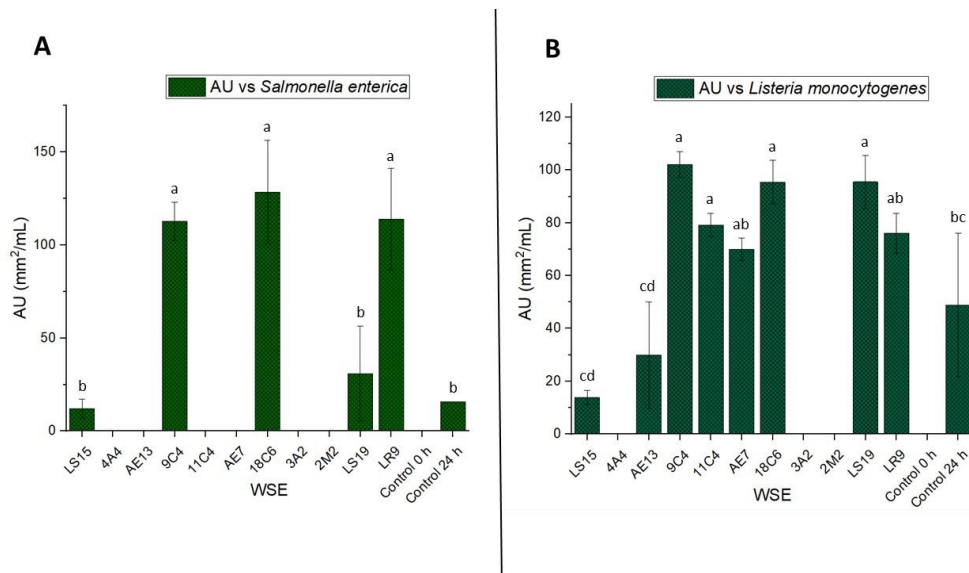


Figura 3. Actividad antimicrobiana de los WSE obtenidos de la fermentación del amaranto. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Electroforesis

En la figura 4 se puede observar el patrón de bandeado obtenido de los WSE. Se pueden visualizar bandas de entre 26.6 y 1.4 kD. Los patrones de bandeado son diferentes en cada WSE, esto es debido a que las BAL tienen un sistema proteolítico cepa-dependiente, lo que provoca el que se puedan obtener péptidos y proteínas hidrolizables de distintos tamaños

dependiendo de la cepa utilizado. Es incluso distinto el sistema proteolítico entre cepas de la misma especie (Cruz-Casas et al., 2023). En el control a las 24 h se observa una banda de alto peso molecular, lo que indica que se llevo a cabo una fermentación espontanea con los microorganismos autóctonos del amaranto.

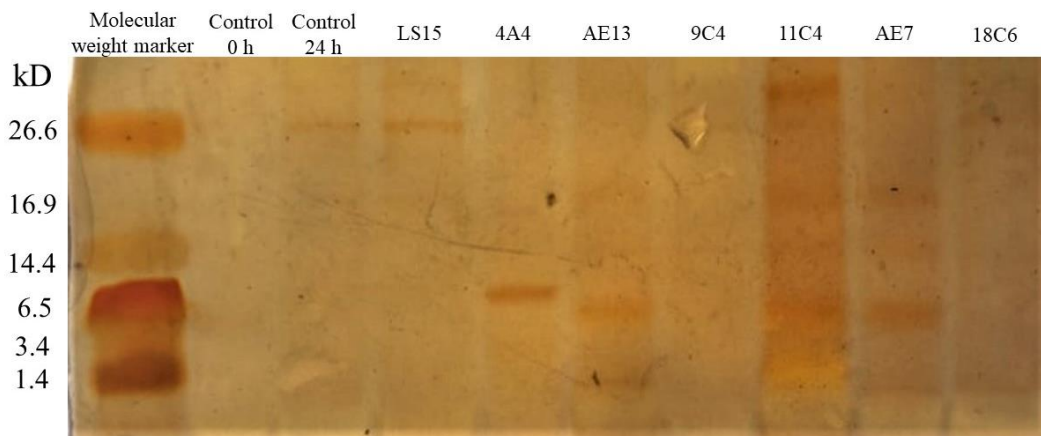


Figura 4. Electroforesis realizada mediante la técnica de Tricine-SDS-PAGE con los WSE obtenidos de la fermentación

Ultrafiltración

WSE LR9 y WSE 18C6 fueron los mejores en las bioactividades mencionadas. Las fracciones >10 kD y 3-10 kD fueron las mejores para el WSE LR9 en el ensayo FRAP, y para el WSE 18C6, fue la fracción >10 kD. En el ensayo ABTS, la fracción >10 kD fue la mejor para el WSE LR9 mientras que para el WSE 18C6, fueron las fracciones >10 kD y 3-10 kD. Estos resultados se atribuyen a los péptidos de mayor longitud de cadena, los cuales muestran efectos sinérgicos (Banihashemi et al., 2020). Con respecto a la actividad antimicrobiana, la fracción >10 kD fue la mejor contra *S. enterica* y *L. monocytogenes*, en ambos WSE. Esto se debe a que las secuencias peptídicas deben contener un número de aminoácidos suficientemente largo (entre 6 y 20 aminoácidos) para abarcar o insertarse en la capa hidrofóbica de la membrana.

Conclusiones

La fermentación del amaranto con BAL demostró ser un método capaz de degradar la proteína de este pseudocereal. Mediante el cual se pueden obtener péptidos con

importantes bioactividades, como la actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana. Sin embargo, este proceso es cepa-dependiente. *Enterococcus faecium*-LR9 y *Leuconostoc mesenteroides*-18C6 son cepas que demostraron producir péptidos con interesantes bioactividades no reportadas previamente.

Referencias

- Alcántara, C., Bäuerl, C., Revilla-Guarinos, A., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., & Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*, 100(1), 25–41. <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>
- Algoory, H. L., & Muhialdin, B. J. (2021). Novel peptides contribute to the antimicrobial activity of camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum* IS10. *Food Control*, 135907. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108057>

- Avaiyarasi, N. D., David Ravindran, A., Venkatesh, P., & Arul, V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.036>
- Ayala-Niño, A., Rodríguez-Serrano, G. M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Avila, M., Sánchez-Franco, J. A., González-Olivares, L. G., & Cepeda-Saez, A. (2019). *Bioactivity of Peptides Released During Lactic Fermentation of Amaranth Proteins with Potential Cardiovascular Protective Effect: An In Vitro Study*. 00(0), 1–6. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0039>
- Ballesteros, C., Poveda, J. M., González-Viñas, M. A., & Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17(4), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.008>
- Banihashemi, S. A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., & Ehsani, A. (2020). Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29(April), 101798. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>
- Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3825–3885. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12651>
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2023). Bioactive protein hydrolysates obtained from amaranth by fermentation with lactic acid bacteria and *Bacillus* species. *Heliyon*, 9(e13491). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13491>
- D'Amico, S., & Schoenlechner, R. (2017). Amaranth: Its Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. In *Gluten-Free Ancient Grains: Cereals, Pseudocereals, and Legumes: Sustainable, Nutritious, and Health-Promoting Foods for the 21st Century*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9.00006-6>
- Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). *Bioactive Peptides*. 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Datta, S., & Roy, A. (2021). Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 555–577. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10110-x>
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832–7836. <https://doi.org/10.1021/jf0512353>
- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73(July), 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>
- Gútiez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., &

- Hernández, P. E. (2013). Enterococcus faecalis strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.019>
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2011). Tricine-SDS-PAGE. In *Protein electrophoresis: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 869). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4>
- Leblanc, J., & Perdigon, G. (2002). Immunomodulating Effects of Peptidic Fractions Issued from Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85, 2733–2742. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-302\(02\)74360-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-302(02)74360-9)
- Mhina, C. F., Jung, H. Y., & Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere*, 253, 126728. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126728>
- Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., & González, E. (2015). Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. 1–20. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12125>
- Muhialdin, B. J., Abdul Rani, N. F., & Meor Hussin, A. S. (2020). Identification of antioxidant and antibacterial activities for the bioactive peptides generated from bitter beans (*Parkia speciosa*) via boiling and fermentation processes. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 109776. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109776>
- Orona-tamayo, D., Valverde, M. E., Paredes-lópez, O., & Orona-tamayo, D. (2018). Bioactive peptides from selected latin american food crops – A nutraceutical and molecular approach. 8398. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.14344>
- 80
- Park, S. J., Sharma, A., & Lee, H. J. (2020). A review of recent studies on the antioxidant activities of a third-millennium food: Amaranthus spp. *Antioxidants*, 9(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/antiox9121236>
- Pepe, O., Villani, F., Oliviero, D., Greco, T., & Coppola, S. (2003). Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00473-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00473-7)
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rizzello, C., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., & Gobbetti, M. (2017). Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.035>
- Rodríguez, M., García Fillería, S. F., & Tironi, V. A. (2020). Simulated gastrointestinal digestion of amaranth flour and protein isolate: Comparison of methodologies and release of antioxidant peptides. *Food Research International*, 138, 109735. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109735>
- Singh, N., Singh, P., Shevkani, K., & Virdi, A. S. (2019). Amaranth : Potential Source for Flour Enrichment. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00010-1>
- Udenigwe, C. C., Abioye, R. O., Okagu, I. U., & Obeme-Nmom, J. I. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 39, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.005>

Artículos

Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108(November 2020), 27–39.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>

Valerio, F., Bavaro, A. R., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Logrieco, A. F., & Lavermicocca, P. (2020). Effect of Amaranth and Quinoa Flours on Exopolysaccharide Production and Protein Profile of Liquid Sourdough Fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00967>

Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernández, J. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). Multi-functional potential of presumptive lactic acid bacteria isolated from Chihuahua cheese. *Foods*, 9(3).
<https://doi.org/10.3390/foods9030276>