

Actividad antioxidante de proteína de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) hidrolizada por Alcalasa y Flavourzyme

Ayala-Niño, A., Sebastian-Nicolas J.L., Pérez-Escalante, E., Añorve-Morga, J., Rodríguez-Serrano, G.M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Ávila, M., González-Olivares, L.G. *

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, Mineral de la Reforma, C.P. 46067, Hidalgo, México.

*lgonzales@uaeh.edu.mx

RESUMEN:

El amaranto es un alimento mexicano rico en proteína, entre 12 y 19%, lo cual lo hace una buena fuente para la obtención de péptidos bioactivos. Debido a esto, en este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de la proteína de amaranto durante su hidrólisis con las enzimas alcalasa y flavourzyme, por separado y en secuencia. La actividad antioxidante se evaluó por tres métodos ABTS, DPPH y FRAP. La hidrólisis realizada con alcalasa y flavourzyme en secuencia obtuvo una mayor concentración de grupos amino libres (7916.06 ± 8.19 mg/L NH₂-), valores que se correlacionaron con la actividad antioxidante por los tres métodos. Los hidrolizados elaborados con flavourzyme fueron los que menor actividad reportaron y menor concentración de grupos amino libres tuvieron (5713.39 ± 320.2 mg/L NH₂-). Con estos resultados se puede concluir que las enzimas comerciales alcalasa y flavourzyme en secuencia son capaces de hidrolizar la proteína de amaranto liberando péptidos con capacidad antioxidante..

ABSTRACT:

Amaranth is rich protein Mexican food, between 12-19%, which makes it a good source for the release of bioactive peptides. In this project antioxidant capacity of amaranth protein was evaluated during an enzymatic hydrolysis with alcalase and flavourzyme by separated and in sequence. Antioxidant capacity was evaluated by three methods, ABTS, DPPH and FRAP. Hydrolysis realized with alcalase and flavourzyme in sequence got higher values in amine groups concentration which was correlated with a high antioxidant activity. Flavourzyme hydrolysates reported the lowest values. With these results it can be concluded that commercial enzymes alcalase and flavourzyme used in sequence hydrolysis are able to release peptides with antioxidant capacity from amaranth protein..

Palabras clave:

Proteína, amaranto, capacidad antioxidante, péptidos bioactivos

Key words:

Protein, amaranth, antioxidant capacity, bioactive peptides

Área: Cereales, leguminosas y oleaginosas

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de origen animal son la mejor fuente de proteínas de alta calidad. Sin embargo, estas son costosas y en algunos casos suelen producir alergias o intolerancias (Tovano *et al.* 2008; Shevkeny *et al.* 2014). El grano del amaranto contiene proteína de alta calidad con un buen balance de aminoácidos, alto en lisina el cual es un aminoácido minoritario en cereales (Gobelink-Mlakar *et al.* 2009; Shevkani *et al.* 2014). La proteína del amaranto (13-19%) tiene alta digestibilidad (90%) (Gobelnik-Mlakar *et al.* 2010) al mismo tiempo que cumple con los patrones de referencia de una dieta adecuada según la FAO/OMS (Gobelnik-Mlakar *et al.* 2009; Rastegi y Shukla, 2013).

Para su estudio, las proteínas en los granos se pueden dividir según su solubilidad, obteniendo albuminas, globulinas y glutelinas (Barba de la Rosa *et al.* 1992). En el amaranto se encuentra principalmente globulina, donde la Globulina 11S o amarantina es el principal constituyente en los aislados de proteína y es el principal almacén de proteína del grano (Quiróga *et al.* 2009; Condés *et al.* 2009). Por otro lado, la globulina 7S: se encuentra en menor cantidad y está compuesta por 3 principales subunidades llamadas α (57-69 kDa), α' (57-72

kDa) y β (42-52 kDa) (García-González *et al.* 2013). Siendo estas fracciones proteicas las principales fuentes para la obtención de péptidos bioactivos.

Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas que tienen impacto positivo en algunas funciones fisiológicas que pueden influir en la salud (Kitts y Weiler, 2003). Dentro de los efectos se encuentran: capacidad antimicrobiana, disminución de la presión arterial, actividad antagonista o agonista opioide y efectos anticolesteromiantes, antitrombótico y antioxidante. Además, algunos péptidos son multifuncionales y pueden tener más de un efecto. Los péptidos bioactivos cuando están encriptados en proteína, están de forma inactiva pero, pueden ser liberados por tres mecanismos, digestión ya sea *in vitro* o *in vivo*, por medio de la fermentación de las proteínas y, para efecto de este proyecto, por hidrólisis enzimática (Hartman y Meisel, 2003).

Hidrólisis por enzimas proteolíticas derivadas de animales, microorganismos o plantas.

Este método hidrolítico consiste en la adición de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de plantas, bacterias u hongos a un medio con la proteína que se desea hidrolizar. A partir de este método se han liberado péptidos bioactivos con distintas actividades biológicas (Kilara y Panyam, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2003).

Las proteinasas hidrolizan la unión entre el carboxilo de un aminoácido y α -amino del siguiente (unión peptídica) en una proteína. Pueden ser exopeptidasas, si hidrolizan desde una extremidad de la cadena y se clasifican en carboxipeptidasas si parten de la extremidad ácida o aminopeptidasas si parten de la extremidad básica. Las endopeptidasas, hidrolizan en cualquier unión peptídica en el interior de las cadenas (según su especificidad) (Figura 1). El término peptidasas suele reservarse para las enzimas que cortan péptidos pequeños, en tanto que el de proteasas o proteinasas se aplica más frecuentemente a las endopeptidasas capaces de hidrolizar péptidos grandes y proteínas (Caffini y col., 1988).

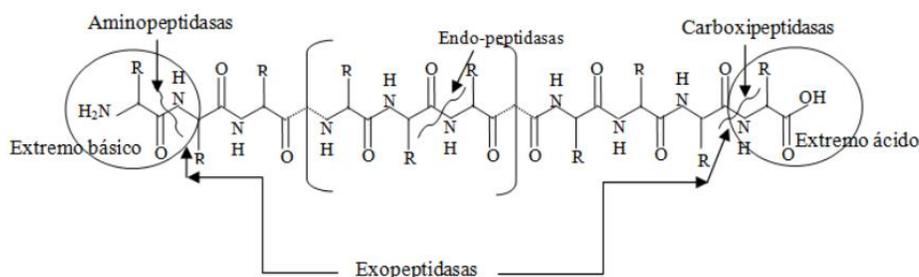


Figura 1. Acción de exopeptidasas y endopeptidasas. (Modificada de Caffini y col., 1988)

Actividad antioxidante de péptidos derivados de amaranto

Debido a que existe evidencia de su alto contenido en proteína (Bressani, 1989), el amaranto ha sido estudiado como fuente de péptidos bioactivos con diferentes actividades (Tovar-Pérez *et al.* 2009; Orsini-Delgado *et al.* 2011; Sabboine *et al.* 2015; Orsini-Delgado *et al.* 2016; Sabboine *et al.* 2016).

Se ha encontrado aumento de la actividad antioxidante, por ABTS y ORAC, tras una digestión gastrointestinal simulada a través de enzimas digestivas, utilizando pepsina y pancreatina. Con esta combinación enzimática se han liberado secuencias peptídicas de bajo peso molecular (AWEEREQGSR, YLAGKPQQEH, IYIEQNGITGM y TEVWDSNEQ), los cuales se han identificado como péptidos con capacidad antioxidante. Una característica general de estas secuencias, es que presentan un residuo aromático voluminoso (Orsini-Delgado *et al.*, 2011; Orsini-Delgado y col., 2016). Además, se ha determinado que la actividad antioxidante aumenta con la degradación proteolítica (péptidos menores de 5 kDa), es decir a mayor fraccionamiento proteico mayor actividad antioxidante (Tironi y Añón 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La semilla cruda de *Amaranthus hypochondriacus* se obtuvo de cultivos de Xochimilco. Las semillas fueron molidas con molino Chopin, obteniendo tres distintas fracciones, Harina (<160 μ), Sémola (<800 μ) y Salvado (>800 μ).

Obtención de fracción proteica de harina de amaranto

La sémola obtenida se desgrasó con n-hexano (10 g de harina/100 mL de n-hexano) durante 24 horas. La harina desgrasada se suspendió en agua destilada 10% w/v, y NaOH al 2 M fue agregado hasta alcanzar un pH de 9. Las proteínas se extrajeron incubándolas por 30 minutos a temperatura ambiente. La dispersión obtenida fue centrifugada por 20 minutos a 10,000 rpm a 20 °C. El sobrenadante fue tomado y las proteínas se precipitaron agregando HCl al 2 M, hasta alcanzar un pH de 5. Después de centrifugar a 10,000 rpm por 20 minutos, el sedimento se separó y suspendió en agua destilada. La suspensión fue ajustada a un pH neutro, liofilizado y almacenado a 4 °C hasta su uso (Martínez y Añón, 1996).

Determinación de grupos amino libres mediante el método del ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

Es posible medir la concentración de péptidos solubles producida durante la hidrólisis proteica mediante el uso del TNBS, el cual forma un complejo cromóforo con aminas primarias en condiciones básicas (pH=8.2), con un máximo de absorción a 340nm. (Sashidhar *et al.*, 1994).

Hidrólisis enzimática

La proteólisis enzimática con alcalasa y Flavourzyme se realizó de acuerdo a Zhuang y col., 2013. Alcalasa y Flavourzyme fueron seleccionados debido a que se ha comprobado su uso para la hidrólisis de proteínas origen vegetal y la formación de péptidos con funciones biológicas (Ma y col. 2014; Zarei y col. 2015). La proteína de amaranto se mezcló con agua desionizada (4:100, w/v). La mezcla obtenida se ajustó a un pH de 9.5 o 7, de acuerdo al pH óptimo de la enzima adicionada. El ajuste se realizó agregando NaOH al 0.1 M o HCl al 0.1M. La reacción se llevó a cabo a la temperatura óptima de cada enzima (55°C alcalasa y 37°C flavourzyme). Se agregó la enzima al 8% (w/v) y la reacción se desarrolló durante 240 min tomando alícuotas de 1 mL cada 20 minutos. Las muestras fueron calentadas a baño maría a ebullición por 10 min.

En el caso de la hidrólisis en secuencia, una vez conocido el tiempo en el que la actividad enzimática de alcalasa disminuía, la enzima fue inactivada con calor, y la misma muestra fue ajustada en las condiciones óptimas de flavourzyme. Todos los hidrolizados fueron centrifugados a 10,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se reservó y se conservó en congelación a -14 °C para los análisis posteriores

Actividad antioxidante

ABTS•+.

Se utilizó el método de Delgado-Andrade y col. (2005) con algunas modificaciones, en el cual se preparó una solución de ABTS•+ (Ácido 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad y transcurrido el tiempo se diluyó en agua desionizada hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.01 . Posteriormente se tomaron 20 μ L de muestra y 980 μ L de la dilución de ABTS•+, se dejó reposar 7 min, la absorbancia se midió a 754 nm, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox a concentraciones de 0, 100, 200, 400, 500 y 600 μ mol/L. La capacidad antioxidante se expresó como μ mol de equivalentes de Trolox por litro (μ mol ET/L).

DPPH

Para la determinación de actividad antirradical se empleó el método DPPH (2,2-Difenil -1-Picril hidrolizado) por Delgado-Andrade y col. (2005). Se elaboró la solución de DPPH al 0.07% en metanol y una solución de Trolox con la que se obtuvo una curva estándar en concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 300 μ mol Trolox/L. Para realizar

la técnica para la curva y la muestra de estudio, se vertieron 100 μ L de la muestra diluida y 500 μ L de la solución de DPPH, se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 60 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm/5 min, a 4 °C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 520 nm. La actividad antioxidante por DPPH se reportó en μ mol equivalente de Trolox por litro (μ mol ET/L).

FRAP

La determinación de la actividad antioxidante por FRAP, se realizó de acuerdo al método descrito por (Benzie y Strain, 1996). Para la preparación de FRAP se elaboró un buffer de acetato de sodio al 0.3 molar pH de 3.6, TPTZ, y FeCl₃ 20 mM mezclando las soluciones anteriores en relación 10:1:1. Se realizó una curva de calibración con FeSO₄ en concentraciones de 0 a 1,000 Mm. Para la técnica se tomaron 30 μ L de cada muestra a la cual se le agregó más 900 μ L de solución FRAP y 90 μ L de agua, se agitó por Vortex y se incubó a 37 °C durante 10 min, posteriormente se leyó la absorbancia a 593 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó agua como blanco. Los resultados se expresaron como micro mol equivalentes de Fe (II) por 100 g de peso fresco (μ mol Fe (II)/100g).

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias para determinar diferencias entre tratamientos. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado, asumiendo varianzas iguales por Tukey ($p \leq 0.05$) con el Software SPSS V-15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grupos Amino Libres

La hidrólisis enzimática consistió en el uso de las enzimas alcalasa y flavourzyme por separado y en secuencia. En la figura 2 se puede observar que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) entre las dos enzimas cuando fueron usadas en sistemas independientes. También se puede observar que la actividad de las enzimas disminuyó a las 2 horas, estos resultados son similares a los reportados por Zhuang y col. 2013 y Ma y col. 2014, donde observaron que el tiempo en el que la actividad enzimática de alcalasa y flavourzyme disminuía después de 90-120 minutos de actividad. El tiempo de actividad enzimática dependerá en la naturaleza de la matriz proteica, así como la cantidad de enzima y sustrato en el medio. Alcalasa obtuvo mayor concentración de grupos amino libres, lo cual coincide con resultados de otros estudios (Kelfala Foh y col. 2010). Una vez conocido el tiempo de disminución enzimática, este fue elegido para el comienzo de la hidrólisis en secuencia con flavourzyme. Tras la adición de flavourzyme, existió un aumento en la concentración de grupos amino libres sin cambios estadísticamente significativos hasta el final de la hidrólisis. Estos resultados son similares a los reportados por Cumby y col. 2008, donde reportaron que el grado de hidrólisis aumentó poco en la hidrólisis en secuencia comparada con la hidrólisis solo con alcalasa, donde se menciona que la hidrólisis con alcalasa no permite la liberación de sustratos propios para flavourzyme.

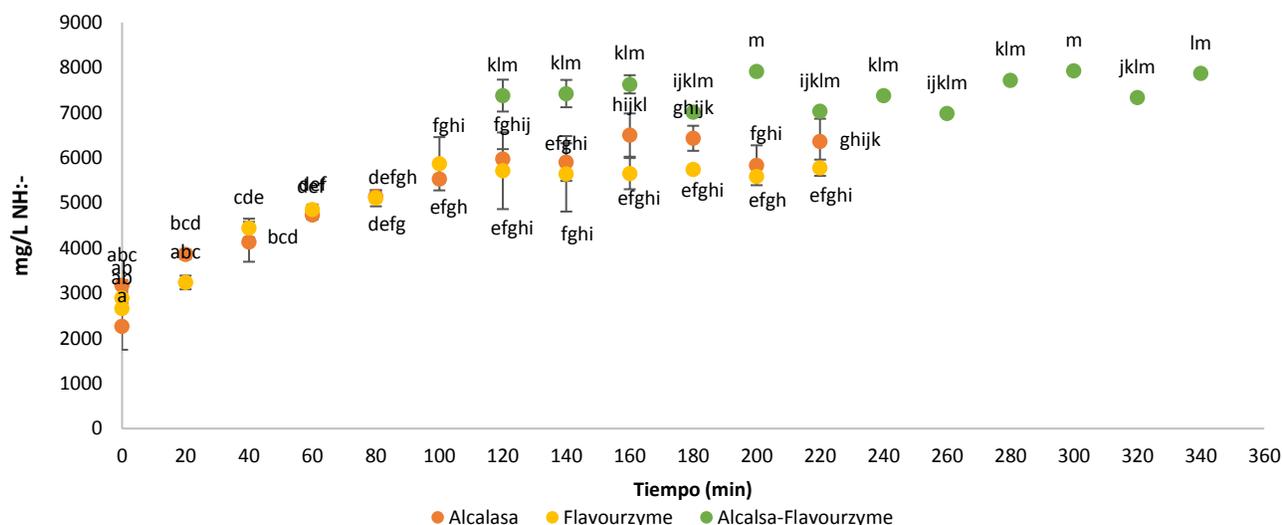


Figura 2. Concentración de grupos amino libres durante hidrólisis enzimática de proteína de amaranto.
^{a-m}Diferentes letras indican diferencia significativa por Tukey ($p \leq 0.05$) en el mismo método hidrolítico.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante fue medida por tres distintos métodos usando los antirradicales ABTS, DPPH y FRAP. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la medición de actividad antioxidante, donde la hidrólisis realizada con ambas enzimas en secuencia obtuvo la mayor actividad antioxidante por los tres métodos. La actividad antioxidante en péptidos se ha visto relacionado con las secuencias peptídicas liberadas durante el proceso de hidrólisis, así como por el tamaño de péptido liberado, entre más pequeño sea el péptido mayor actividad tendrá (cadenas peptídicas menores a 20 aminoácidos) (Zou y col 2016). Debido a esto se obtuvo una mayor actividad antioxidante en la muestra cuya concentración de grupos amino fue mayor.

También existió un mayor incremento en la actividad evaluada por FRAP tras la adición de flavourzyme, esto puede ser debido a la liberación de péptidos con distintos mecanismos de acción, algunos son capaces de quelar agentes reactivos, otros son donadores de electrones o hidrógeno, pudiendo obtener distintos comportamientos en las técnicas evaluadas (Virtanen y col., 2007)

Tabla 1. Actividad antioxidante de proteína de amaranto hidrolizada

Enzima	DPPH ($\mu\text{mol ET/mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)/mL}$)
Alcalasa	340.17±10.95 ^b	420.67±3.17 ^b	241.71±9.38 ^b
Flavourzyme	281.92±4.97 ^a	398.36±3.60 ^a	226.29±11.20 ^a
Alcalasa-flavourzyme	382.63±6.38 ^c	440.67±5.80 ^c	592.54±29.29 ^c

^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa por Tukey ($p \leq 0.05$) en la misma determinación.

CONCLUSIÓN

Con estos resultados se puede concluir que la proteína de amaranto es fuente de péptidos con capacidad antioxidante los cuales pueden ser liberados con la acción de enzimas como lo son alcalasa y flavourzyme. La hidrólisis en secuencia, es el proceso que obtuvo mayor concentración de grupos amino libres, los cuales están relacionados con una mayor bioactividad, comportamiento que se obtuvo en este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Barba de la Rosa, A.P., Gueguen, J., Paredes-López, O., & Viroben, G. (1992). Fractionation procedure, electrophoretic characterization and aminoacid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (6), 931-936.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70–76.
- Caffini N., López, L.M., Natalucci, C.L., & Priolo, N. (1988). Proteasas de plantas Superiores. I. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 7, 195-213.
- Condés, M.C., Scilingo, A.A., & Añón, M.C. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT – Food Science and Technology*, 42 (5), 963–970.
- Cumby, N., Zhong, Y., Nacz, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109 (2008) 144-148.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., & Ondetti, M.A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl aminoacids. *Biochemistry*, 16 (25), 5484-5491.
- Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A., & Morales, F.J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), 7832-7836.
- García-González, A., Flores-Vázquez, A.L., Barba de la Rosa, A.P., Vázquez-Martínez, E.A., & Ruiz-García J. (2013). Amaranth 7S globulin, Langmuir films and its interaction with 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine at the air–fluid interface. *The Journal of Physical Chemistry, B* 117, (45), 14046-14058.
- Grobelnik-Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., & Bavec, F. (2009). Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*, 6 (2), 43–53.
- Grobelnik-Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., & Bavec, F. (2010). Grain amaranth as an alternative and prospective crop in temperate climate. *Geography Journal of Geographical Sciences*, 5 (1), 135–46.
- Kelfala-Foh, M.B., Amadou, I., Mabel-Foh, B., Kamara, M.T., & Xia W. (2010). Functionality and antioxidant properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Science*, 11 (4), 1851-1869.
- Kilara, A., & Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (6), 607–633.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (16), 1309–1323.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides— opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (16), 1297–1308.
- Jäkälä, P., & Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals*, 3 (1) 251-272.
- Liu, M., Bayjanov, R.J., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen R.J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11 (36), 11-36.
- Ma, Y., Wang, L., Sun, X., Zhang, J., Wang J., & Li, Y. (2014). Study on Hydrolysis Conditions of Flavourzyme in Soybean Polypeptide Alcalase Hydrolysate and Soybean Polypeptide Refining Process. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6, 1027-1032.
- Mann, B., Athira S., Sharma R., & Bajaj R. (2017). Bioactive peptides. En: *Yogurt in health and disease prevention*. Editado por Nagendra P. Shah. Reino Unido: Academic Press, pp. 411-426.
- Marcone, S., Belton, O., & Fitzgerald, D.J. (2016) Mirl-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role I atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*. 83 (1), 152-162.
- Martínez, N.E., & Añón, C.M. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (9), 2523-2530.

- Orsini-Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M.C., & Torini, V.A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of Amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197 (15), 1160-1167.
- Orsini-Delgado, M.C., Tironi, V.A., & Añón, M.C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology*, 44 (8), 1752-1760.
- Quiróga, A., Martínez, N.E., Rogniaux, H., Geariron, A., & Añón, C.M. (2009). Globulin-p and 11S-globulin from *Amaranthus hypochondriacus*: are two isoforms of the 11S-globulin. *Protein Journal*, 28 (9-10), 457-467.
- Rastogi, A., & Shukla, S. (2013). Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 53 (2), 109-125.
- Sabbione, A.C., Nardo, E.A., Añón, M.C., & Scilingo, A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204-2014.
- Sabbione, A.C., Scilingo, A., & Añón, M.C. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 60 (1), 171-177.
- Sashidhar, R.B., Capoor, A.K., & Ramana, D. (1994). Quantification of amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods*, 167 (1-2), 121-127.
- Shevkani, K., Singh, N., Chand-Rana, J., & Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science Technology* 49 (2), 541-550.
- Tavano, O.L., Da-Silva, S.I.Jr., Demonte, A., & Neves, V.A. (2008). Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (22), 11006-11010.
- Tironi, V.A., & Añón, M.C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43 (1), 315-322.
- Tovar-Pérez, E.G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116 (2), 437-444.
- Vertinen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007) Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (3), 106-115.
- Zarei, M., Forghani, B., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., & Saari, N. (2015). In vitro and in vivo antihypertensive activity of palm kernel cake protein hydrolysates: Sequencing and characterization of potent bioactive peptides. *Industrial Crops and Products*, 76, 112-120.
- Zhang, B.S., Zhang, W., & Xu, S.Y. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal American Oil Chemistry Society*, 85 (6), 521-527.
- Zhuang, H., Tang, N., y Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Food*, 5 (4), 1810-1821.
- Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., & Xia, W.Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 12 (6), 1-14.