



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**Evaluación de las Propiedades Tecnofuncionales y
Biológicas de los Hidrolizados de Proteína de la Hoja
de Yuca (*manihot esculenta crantz*) Variedad
Venezolana**

Lina Marcela Suárez Restrepo

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2022



Evaluación de las Propiedades Tecnofuncionales y Biológicas de los Hidrolizados de
Proteína de la Hoja de Yuca (*manihot esculenta crantz*) Variedad Venezolana

Lina Marcela Suárez Restrepo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesores (a):

José Edgar Zapata Montoya
Chemical Engineer, MSc, Ph.D

Línea de Investigación:

Alimentos

Grupo de Investigación:

Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2022

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Planteamiento del Problema	4
1.2 Objetivos	5
1.2.1 <i>Objetivo General</i>	5
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	5
2 MARCO TEÓRICO	7
2.1 Yuca (<i>manihot esculenta crantz</i>)	7
2.1.1 <i>Producción de yuca a nivel mundial y nacional</i>	7
2.1.2 <i>Hojas de yuca</i>	8
2.1.3 <i>Aprovechamiento de hojas de yuca</i>	10
2.2 Proteína vegetal de origen foliar	11
2.3 Extracción de proteína vegetal de origen foliar	11
2.3.1 <i>Extracción alcalina de proteína vegetal de origen foliar</i>	12
2.3.2 <i>Interacción de compuestos fenólicos durante la extracción de proteína</i>	14
2.4 Hidrólisis de proteínas	15
2.4.1 <i>Hidrólisis enzimática de proteínas</i>	16
2.4.2 <i>Proteasas</i>	17
2.4.3 <i>Medida del grado de hidrólisis</i>	20
2.5 Péptidos con propiedades biológicas <i>in vitro</i>	21
2.6 Actividad antioxidante	23
2.6.1 <i>La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)</i>	25
2.6.2 <i>Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)</i>	26
2.6.3 <i>Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC)</i>	26

2.6.4	<i>Quelante de metales</i>	27
2.6.5	<i>Estrés oxidativo en líneas celulares o ensayo de antioxidantes celulares (CAA)</i>	28
2.7	Purificación de péptidos.....	29
2.7.1	<i>Desalado de hidrolizados</i>	30
2.7.2	<i>Purificación de hidrolizados por ultrafiltración</i>	31
2.7.3	<i>Métodos cromatográficos</i>	32
2.8	Secuenciación de péptidos	33
2.9	Actividades tecno-funcionales	34
2.9.1	<i>Actividad espumante</i>	35
2.9.2	<i>Actividad emulsificante</i>	37
2.9.3	<i>Actividades funcionales de proteínas de hoja de yuca</i>	39
3	METODOLOGÍA	41
3.1	Reactivos e insumos.....	41
3.2	Pretratamiento de hoja de yuca	41
3.3	Composición proximal.....	42
3.4	Fraccionamiento secuencial de las proteínas de harina de hoja de yuca	44
3.5	Actividad enzimática utilizando caseína como sustrato	45
3.6	Análisis de aminoácidos	46
3.7	Determinación de enlaces peptídicos totales (h_{tot}).....	47
3.8	Extracción de proteína de hoja de yuca	47
3.8.1	<i>Extracción de proteínas mediante método alcalino</i>	48
3.9	Hidrólisis enzimática de extracto proteico y harina de hoja de yuca.....	49
3.9.1	<i>Grado de hidrólisis de hidrólisis enzimática</i>	50
3.10	Optimización de condiciones de operación	51

3.10.1	<i>Optimización de la extracción alcalina de proteína de hoja de yuca</i>	51
3.10.2	<i>Optimización de la hidrólisis de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L®</i>	52
3.11	Bioactividades	54
3.11.1	<i>Actividad antioxidante</i>	54
3.11.1.1	<i>Determinación de fenoles totales</i>	54
3.11.1.2	<i>Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)</i>	54
3.11.1.3	<i>Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)</i>	55
3.11.1.4	<i>Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC)</i>	55
3.11.1.5	<i>Quelante de calcio o Capacidad de unión al calcio</i>	56
3.11.1.6	<i>Quelante de hierro o ensayo de capacidad de quelación del Fe²⁺</i>	56
3.11.2	<i>Estrés oxidativo en línea celular VSMC A7r5</i>	57
3.11.2.1	<i>Cultivo celular</i>	57
3.11.2.2	<i>Citotoxicidad</i>	57
3.11.2.3	<i>Detección de superóxido</i>	57
3.12	Ensayo de anticoagulación	58
3.13	Actividades tecno-funcionales	59
3.13.1	<i>Actividad espumante</i>	59
3.13.2	<i>Actividad emulsificante</i>	60
3.14	Purificación y secuenciación	60
3.14.1	<i>Purificación por ultrafiltración</i>	61
3.14.2	<i>Purificación por hidrofobicidad</i>	61
3.14.3	<i>Métodos cromatográficos</i>	62
3.14.4	<i>Análisis LC-MS/MS</i>	62
3.15	Análisis estadístico	62
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65

4.1	Caracterización de hojas de yuca.....	65
4.2	Extracción de proteína de hojas de yuca mediante método alcalino	68
4.3	Hidrólisis enzimática de extracto proteico alcalino de hojas de yuca	69
4.4	Extracción de proteína mediante hidrólisis enzimática de hoja de yuca	71
4.5	Optimización de la extracción de proteína mediante método alcalino	76
4.5.1	<i>Efecto de los factores sobre las respuestas en la extracción alcalina de proteínas.....</i>	76
4.5.2	<i>Efecto del tiempo en la extracción de proteína mediante método alcalino sobre las variables respuesta</i>	81
4.6	Optimización de hidrólisis enzimática de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®]	82
4.6.1	<i>Efectos de los factores sobre las respuestas en la hidrolisis enzimática de hoja de yuca</i>	82
4.6.2	<i>Efecto del tiempo en hidrólisis enzimática de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] sobre las variables respuesta.....</i>	87
4.7	Estrés oxidativo en línea celular VSMC A7r5 del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®]	90
4.8	Actividades tecno-funcionales del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®]	93
4.8.1	<i>Actividad espumante y estabilidad de la espuma del extracto proteico alcalino e hidrolizado enzimático de hoja de yuca.</i>	93
4.8.2	<i>Actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]</i>	96
4.9	Caracterización del extracto proteico de hojas de yuca e hidrolizado enzimático de hojas de yuca con Alcalasa 2,4L [®]	99
4.10	Purificación y secuenciación de péptidos	101
4.10.1	<i>Purificación por membranas de celulosa de extracto proteico alcalino de hoja de yuca</i>	102

4.10.2	<i>Purificación de péptidos antioxidantes por membranas de celulosa de hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]</i>	104
4.10.3	<i>Purificación de la fracción de hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] mediante métodos cromatográficos</i>	107
4.10.3.1	<i>Separación por hidrofobicidad usando columna de cartucho C18</i>	107
4.10.3.2	<i>Purificación por RP-HPLC</i>	109
4.10.4	<i>Secuenciación</i>	111
5	CONCLUSIONES	116
6	RECOMENDACIONES	119
7	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	122
8	REFERENCIAS	125

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del proceso de hidrólisis enzimática in vitro de sustratos vegetales con enzimas proteolíticas	18
Tabla 2 Péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteína de origen vegetal con propiedades biológicas.	22
Tabla 3 condicione de hidrólisis: enzima, temperatura y pH.	47
Tabla 4 Corridas experimentales del diseño central compuesto para establecer las condiciones de NaOH, T y S de la extracción de proteína.	49
Tabla 5 Corridas experimentales del diseño 1-optimal para hidrólisis enzimática de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®] .	50
Tabla 6 Caracterización fisicoquímica de harina de hoja de yuca variedad venezolana.	65
Tabla 7 Tipos de proteína presente en la hoja de yuca variedad venezolana	66
Tabla 8 Aminograma de hoja de yuca variedad venezolana	67
Tabla 9. Recuperación de proteína, grado de hidrólisis y actividad antioxidante de extracto proteico de hojas de yuca.	68
Tabla 10 Comparación de la actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de concentrado de proteína con Alcalasa 2,4L [®] , Neutrased 0,8L [®] , Flavourzyme [®] y Protamex [®] .	70
Tabla 11 Propiedades de los hidrolizados de hoja de yuca preparados usando Alcalasa 2,4L [®] ; Neutrased 0,8L [®] ; Flavourzyme [®] y Protamex [®] .	71
Tabla 12 Comparación de la actividad quelante de metales y anticoagulante de los hidrolizados de hoja de yuca preparados con Alcalasa 2,4L [®] , Neutrased 0,8L [®] , Flavourzyme [®] y Protamex [®] .	74
Tabla 13 Corridas experimentales y variables respuesta del diseño central compuesto para establecer las condiciones de NaOH, T y S del tratamiento para obtener el extracto proteico.	77

Tabla 14 ANOVA de las variables respuesta del diseño factorial central compuesto en el tratamiento alcalino para obtener extracto proteico de hoja de yuca.	78
Tabla 15 Respuesta predichas y experimentales del tratamiento alcalino para obtener extracto proteico de hoja de yuca bajo condiciones optimizadas de los factores.	80
Tabla 16 Propiedades del extracto proteico obtenido bajo condiciones optimizadas (T: 50°C, NaOH: 1M y S: 6%) en función del tiempo.	81
Tabla 17 Corridas experimentales del diseño I-optimal con los valores de las variables respuestas de la hidrólisis enzimática de la harina de hojas de yuca con Alcalasa 2,4L [®] .	83
Tabla 18 La ANOVA de las variables respuesta del diseño en la hidrólisis enzimática de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] .	84
Tabla 19 Respuestas predichas y experimentales de hidrólisis enzimática de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] obtenida bajo condiciones optimizadas de los factores.	86
Tabla 20 Propiedades del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] obtenida bajo condiciones optimizadas en función del tiempo y GH.	88
Tabla 21 Caracterización fisicoquímica de extracto proteico de hojas de yuca (PHY) e hidrolizado enzimático de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L [®] (HHY) a condiciones optimizadas	99
Tabla 22 Contenido de aminoácidos de extracto proteico de hojas de yuca (PHY) e hidrolizado enzimático de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L [®] (HHY) a condiciones optimizadas	100
Tabla 23 Propiedades de las fracciones por peso molecular del extracto proteico de hoja de yuca obtenido a condiciones optimizadas.	102
Tabla 24 Propiedades de las fracciones con diferente peso molecular del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] obtenido bajo condiciones optimizadas.	104
Tabla 25 Propiedades de las fracciones de F3 separadas por hidrofobicidad del hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®]	107
Tabla 26 Propiedades de las fracciones de F3-1, F3-2 y F3-3 separadas por RP-HPLC del hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L [®] .	111

Tabla 27 Secuencia de péptidos de F3-2-2 del hidrolizado enzimático de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®]. 113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mecanismo de hidrólisis de una proteasa (Benítez et al. 2008). E: enzima, S: sustrato, P,P': péptidos resultantes, kn: constante de velocidad de reacción. 16
- Figura 2 Formación de espuma por proteínas. 35
- Figura 3 Montaje utilizado para realizar la extracción de proteína mediante método alcalino. 1: Plancha de agitación; 2: Chaqueta de recirculación; 3: Reactor; 4: Agitador magnético; 5: Mangueras recirculación; 6: Baño de calentamiento. 49
- Figura 4 Montaje utilizado para realizar la hidrólisis enzimática. 1: Titrand; 2:NaOH; 3: Dosificador; 4: Electrodo combinado; 5: Chaqueta de recirculación; 6: Reactor; 7: Agitador magnético; 8: Plancha de agitación; 9: Mangueras recirculación; 10: Baño de calentamiento. 51
- Figura 5 Superficies de respuesta para las variables respuesta: a. proteína, b. Eficiencia, c. FRAP y d. TEAC. A, NaOH; B, T; C, Sustrato. NaOH, concentración de hidróxido de sodio; M, Molaridad; T, temperatura; °C, centígrados; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; µmol ET/g, µmol Equivalente Trolox por gramo. 79
- Figura 6 Superficie de respuesta de las variables respuesta: a) GH (%), b) Proteína (g/L), c) Eficiencia (%) y d) TEAC (µmol TE/g). T, temperatura; E/S, enzima/sustrato; E, eficiencia de extracción de proteína; P, proteína; GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; µmol ET/g, µmol Equivalente Trolox por gramo. 85
- Figura 7 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por PHY (n = 3). Las células fueron pretratadas con 0,1 mg de PHY/mL de medio por 1 h antes de 0.5 h de estimulación con 1 µM Ang II. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, p < 0,05, comparado con el control; **, p < 0,01, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras. 91
- Figura 8 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por HHY (n = 3). Las células fueron pretratadas con 0,1 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 µM. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, p < 0,05, comparado con el control; **, p < 0,01, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras. 92

Figura 9 Actividad espumante y estabilidad de la espuma del extracto proteico alcalino obtenido a condiciones optimizadas en función del pH.	93
Figura 10. Actividad espumante y estabilidad de la espuma del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] obtenido bajo condiciones optimizadas en función de GH y pH a una concentración de 5 g/L. a. pH: 3; b. pH: 5, c. pH: 7, d. pH: 10 y e. pH: 11. GH: grado de hidrólisis.	94
Figura 11 Actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del extracto proteico alcalino obtenido a condiciones optimizadas en función del pH.	96
Figura 12 Actividad emulsificante y estabilidad de la actividad emulsificante del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L [®] obtenido bajo condiciones optimizadas en función de GH y pH. a. pH: 3; b. pH: 5, c. pH: 7, d. pH: 10 y e. pH: 11.	97
Figura 13 Viabilidad de la línea celular A7r5 tratada con las fracciones con diferente peso molecular de PHY (n =6). Diferentes letras indican diferencia significativa en $p < 0,05$.	103
Figura 14 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por fracciones de PHY con diferente peso molecular (n = 3). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.	103
Figura 15 Viabilidad de la línea celular A7r5 tratada con las fracciones con diferente peso molecular de HHY (n =6). Diferentes letras indican diferencia significativa en $p < 0,05$.	105
Figura 16 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por fracciones de HHY con diferente peso molecular (n = 3). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control. **, $p < 0,01$, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.	106
Figura 17 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por las fracciones derivadas de F3 del hidrolizado	108

enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] (n = 3). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, p < 0,05, comparado con el control. **, p < 0,01, *, p < 0,05 en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

Figura 18 Perfiles de elución de la separación por fase reversa (RP-HPLC.) de las fracciones de hidrolizado de hoja de yuca obtenido con Alcalasa 2,4L[®] a condiciones optimizadas. a. F3-1; b. F3-2; c. F3-3. ACN: concentración de acetonitrilo. 110

Figura 19 Espectro LC-MS/MS de F3-2-2 del hidrolizado enzimático de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®]. 112

GLOSARIO

	<i>Símbolos</i>
Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	ABTS ^{•+}
Aminoácidos antioxidantes	AAA
Aminoácidos esenciales	AAE
Aminoácidos hidrofóbicos	AAH
Aminoácidos totales	AAT
Association of Official Analytical Chemists	AOAC
Capacidad antioxidante equivalente Trolox	TEAC
Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno	ORAC
Cloruro de trifeniltetrazol	TPTZ
Concentración molar del aminoácido i ($\mu\text{mol/mL}$)	$[A_i]$
Ensayo de antioxidantes celulares	CAA
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Espectrometría de masa	MS
Extracción en fase sólida	SPE
Extracto proteico de hoja de yuca preparado a condiciones optimizadas	PHY
Fracción molar del aminoácido i	F_i
Fibra detergente acida	FDA
Fibra detergente neutra	FDN
Grado de hidrólisis	GH
Hidrolizado de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L a condiciones optimizadas	HHY
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Hoja de yuca	HY
Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno	HAT
Métodos basados en la transferencia de electrones	ET
Número de enlaces peptídicos por gramo de proteína	h_{tot}
o-ftalaldehído	OPA

Peso molecular de cada aminoácido <i>i</i>	(PM) <i>i</i>
Poder antioxidante reductor de iones férricos	FRAP
Plasma pobre en plaquetas	PPP
Rendimiento de proteína extraída	E
Tiempo de protrombina	PT
Tiempo de tromboplastina parcial activada	APTT
9-fluorenilmetoxicarbonilo	FMOC

RESUMEN

A nivel mundial en la industria de alimentos, hay una tendencia hacia la búsqueda de desarrollo de ingredientes funcionales, que enriquecen o fortalecen las propiedades sensoriales y físicas de los alimentos, además, que aporten componentes beneficiosos para la salud. Para este fin, se ha fijado el interés en la utilización de proteínas de origen vegetal. La planta de yuca (*manihot esculenta crantz*) es conocida por la producción de tubérculos ricos en almidón, sin embargo, su hoja tiene alto contenido de proteína, que puede ser usado para obtención de péptidos bioactivos. Inicialmente se evaluó la actividad antioxidante, quelante de metales y anticoagulante de extractos proteicos e hidrolizados enzimáticos preparados con hoja de yuca variedad Venezolana y con cuatro proteasas (Alcalasa 2,4L[®], Flavourzyme[®], Neutrasa 0,8L[®] y Protamex[®]). Los tratamientos de extracción mediante álcali y la hidrólisis enzimática de hoja de yuca fueron seleccionados para optimizar las condiciones de operación sobre el rendimiento de extracción de proteína y la actividad antioxidante. La metodología de superficie de respuesta fue usada para modelar y optimizar las variables respuestas con el fin de maximizar los valores de proteína, rendimiento de extracción de proteína, y la actividad antioxidante, respectivamente. Luego, a la extracción mediante álcali y la hidrólisis enzimática a condiciones obtenidas del diseño experimental se les evaluó el comportamiento de la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y el contenido de proteína en el tiempo. Después, se evaluó las actividades tecnofuncionales (actividad emulsificante y espumante) del extracto de proteína (PHY) y el hidrolizado enzimático (HHY) obtenidos a condiciones optimizadas. PHY y HHY fueron fraccionadas por ultrafiltración en cuatro fracciones, las cuales fueron usadas para evaluar la inhibición del estrés oxidativo en la línea celular A7r5. Las fracciones con actividades más altas fueron fraccionadas con base a su hidrofobicidad. Posteriormente, la fracción con mayor actividad en ensayos *in vitro* químicos y biológicos fue sometida a purificación por RP-HPLC para identificar péptidos mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Los resultados sugieren que la hoja de yuca variedad Venezolana podría ser fuente de compuestos con actividad antioxidante y actividad emulsificante con potencial uso en la industria de alimentos.

Palabras claves: Actividad antioxidante; Alcalasa 2,4L[®], Estrés oxidativo; Hidrólisis enzimática, Hoja de yuca.

ABSTRACT

Worldwide in the food industry, there is a trend toward the search for the development of functional ingredients that enrich or strengthen the sensory and physical properties of food, in addition, that providing beneficial components for health. For this purpose, interest has been fixed on the use of proteins of plant origin. The cassava plant (*Manihot esculenta crantz*) is known to produce tubers rich in starch, however, its leaf has a high protein content, which can be used to obtain bioactive peptides. Initially, the antioxidant, metal chelating, and anticoagulant activity of protein extracts and enzymatic hydrolysates were prepared with Venezuelan variety cassava leaf and with four proteases (Alcalase 2.4L[®], Flavourzyme[®], Neutrase 0.8L[®] and Protamex[®]) were evaluated. The alkali extraction treatments and the enzymatic hydrolysis of the cassava leaf were selected to optimize the operating conditions on the protein extraction yield and the antioxidant activity. Response surface methodology was used to model and optimize response variables to maximize protein values, protein extraction yield, and antioxidant activity, respectively. Then, extraction by alkali and enzymatic hydrolysis at conditions obtained from the experimental design, the behavior of antioxidant activity, total phenol content, and protein content over time were evaluated. Then, techno-functional activities (emulsifying and foaming activity) of the protein extract (PHY) and the enzymatic hydrolysate (HHY) obtained under optimized conditions were evaluated. PHY and HHY were fractionated by ultrafiltration into four fractions and antioxidant activity was corroborated in the A7r5 cell line. The fractions with higher activities were fractionated based on their hydrophobicity. Subsequently, the fraction with the highest activity *in vitro* chemical and biological assays were subjected to purification by RP-HPLC to identify peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results suggest that the Venezuelan variety cassava leaf could be a source of compounds with antioxidant activity and emulsifying activity with potential use in the food industry.

Keywords: Antioxidant activity; Alcalase 2.4L[®], Oxidative stress; Enzymatic hydrolysis, Cassava leaf.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*manihot esculenta crantz*) es una planta perenne leñosa, pertenece a la familia *Euphorbiaceae*. Las raíces o tubérculos son la parte comúnmente consumida como fuente de energía debido a su alto contenido de carbohidratos, así mismo, se utiliza como materia prima para producir harina de yuca (Chahyadi y Elfahmi, 2020). Por otra parte, la hoja de la planta de yuca es una fuente rica en proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas, hierro, zinc, manganeso, magnesio y calcio (Manjula et al., 2020). La hoja de yuca es uno de los recursos vegetales con mayor cantidad de proteína, esta puede variar entre el 17% y el 38% de la masa seca (Achidi et al., 2008; Ayodeji, 2005; Castellanos, Altamirano y Moretti, 1994; Ravindran, 1988). Por su contenido de nutrientes, las hojas de yuca son consumidas como verduras en varios platos de África, Asia y América latina (Chahyadi y Elfahmi, 2020), sin embargo, hay muchos países donde no se consume a pesar de ser cultivada a gran escala y ser de fácil consecución. Por lo anterior, las hojas en ocasiones son consideradas como un desecho agroindustrial por su baja utilización debido a la falta de información técnica y científica que permita un mayor aprovechamiento (Latif y Müller, 2015).

Los estudios sobre la hoja de yuca reportados hasta el momento son en su mayoría de extractos ricos en polifenoles con actividad antioxidante (Chahyadi y Elfahmi, 2020; Laya y Koubala, 2020), antiinflamatoria (Tsumbu et al., 2011), hepatoprotectora (Tao et al., 2015) e insecticida (Manjula et al., 2020). Como fuente proteica, las hojas de yuca han sido utilizadas en la formulación de dietas para consumo humano (Giraldo, Velasco y Villada, 2008), dietas para aves (Oludare, 2006), y dietas para cerdos (Nguyen et al., 2012).

Hoy en día, la hidrólisis enzimática es una técnica predominante para dar valor agregado a subproductos ricos en proteína (Ishak y Sarbon, 2018; León, Jiménez y Davila, 2015; Sila y Bougatef, 2016), debido a sus condiciones moderadas de operación que no causan daños a los aminoácidos, genera un producto considerado seguro, saludables y de bajo costo (Jin et al., 2016).

Al hidrolizar con enzimas se produce cambios moleculares en las proteínas, que se ven reflejados en el mejoramiento de las propiedades funcionales y biológicas, que las proteínas en su forma nativa no poseen (Maestri, Marmiroli y Marmiroli, 2016). Las propiedades tecnofuncionales que se ven beneficiadas por la hidrólisis son la solubilidad, capacidad emulsionante y capacidad espumante (Fathollahy et al., 2021); también, mejora las propiedades biológicas como la actividad antimicrobiana (da Cruz et al., 2020), actividad antihipertensiva (Fan et al., 2020), la actividad antiinflamatoria (Maestri et al., 2016) y la actividad antioxidante (Kimatu et al., 2017). Diversos vegetales han sido usados como fuentes de proteínas para la obtención de hidrolizados con actividad biológica como la actividad antioxidante que se ha encontrado en hidrolizados de proteínas del maíz (Jin et al., 2016; Tang et al., 2010; L. Wang et al., 2018), garbanzo (Zhang et al., 2010), cebada y linaza (Kulczyk et al., 2016; Xia et al., 2012). Por otro lado, se han obtenido péptidos con actividades asociadas a la actividad antioxidante, como son péptidos de granos de cebada (McClellan, Beggs y Welch, 2014) y trigo (Ma et al., 2006; Maejima et al., 2011; Wu et al., 2016) que presentaron actividad antihipertensiva. Además, péptidos de salvado de avena con actividad quelante de metales (Esfandi, Willmore y Tsopmo, 2019).

Se han usado diferentes proteasas para la hidrólisis de proteína de fuentes vegetales, entre las que se cuenta Alcalasa (Wu et al., 2016; Xu, Sun y Wu, 2014), Flavourzyme (Yust et al., 2013), Neutrassa (Zhang et al., 2010), Protamex (Wang et al., 2015) y la combinación secuencial de ellas (Jin et al., 2016; Kou et al., 2013; Ma et al., 2006). El tipo de proteasa afecta la calidad y cantidad de los péptidos obtenidos, por lo que el tratamiento de las proteínas con diferentes proteasas produce varios tipos de hidrolizados que exhiben diversas actividades biológicas.

Aunque se han usado materiales vegetales para la obtención de hidrolizados de proteína, las hojas han sido un material poco estudiado. Por esto, se propone estudiar las hojas de yuca como fuente de sustancias con propiedades tecnofuncionales y bioactivas mediante el uso de la hidrólisis enzimática de proteínas. Inicialmente se realizaron varios tratamientos con enzimas para definir cual presentaba mayor recuperación de proteína, grado de hidrólisis y actividades biológicas. Una vez los tratamientos fueron seleccionados, la optimización de las condiciones de operación fue

llevada a cabo, seguida del estudio de las actividades biológicas y tecnofuncionales. La actividad biológica en la que se profundizó posteriormente fue la actividad antioxidante. Los hidrolizados que presentaron mayor actividad fueron purificados por membranas de ultrafiltración, por hidrofobicidad y PR-HPLC para identificar péptidos bioactivos por LC-MS/MS.

1.1 Planteamiento del Problema

Como es de amplio conocimiento las prácticas agrícolas tradicionalmente han priorizado, por encima de todo, maximizar la producción para suplir la demanda de alimentos, olvidando la conservación del medio ambiente, donde en muchas ocasiones incorporan al medio ambiente altas cantidades de materia orgánica y los lixiviados generados de su descomposición, ya sea al suelo o al agua, superando su capacidad de procesamiento al agotar el oxígeno disponible; a su vez la liberación de nutrientes provoca fenómenos de eutrofización en las aguas. El cultivo de yuca no es ajeno a este fenómeno. La industria de producción de yuca genera gran cantidad de subproductos como son las hojas, las cuales a nivel mundial para el 2018 tuvo una producción de materia seca de 55 millones de toneladas (FAO, 2019; Latif y Müller, 2015; da Silva et al., 2012) y a nivel nacional 438 mil toneladas con un rendimiento entre 13,7 t/ha y 19,2 t/ha (material húmedo) en un cultivo con una densidad de 10.000 plantas/ha (CORPOICA, CLAYUCA y CIAT, 1986; FAO, 2019). Por otro lado, el crecimiento de la población mundial (más del 30% de los 7.500 millones de personas existentes estimados para 2050) y los cambios en los patrones alimentarios mundiales hacia un mayor consumo de alimentos a base de proteína aumentan las preocupaciones mundiales sobre la escasez de proteína y fomentan la investigación exhaustiva para encontrar nuevas fuentes de proteína sostenibles (Momen, Alavi y Aider, 2021).

En Colombia, las hojas de yuca son un subproducto, una vez cosechada la raíz de la planta las hojas son descartadas al medio ambiente. Se requiere el desarrollo de técnicas que permitan el uso de este material de descarte para generar productos con valor agregado. Estas técnicas pueden estar orientadas a la obtención de ingredientes para la industria de alimentos, ya que a nivel global

hay una tendencia hacia la búsqueda de desarrollo de ingredientes funcionales, que, además de enriquecer o fortalecer las propiedades sensoriales y físicas de los alimentos, posean componentes beneficiosos para la salud (Araya y Lutz, 2003; de Castro y Sato, 2015; León et al., 2015), ya que se ha relacionado la prevalencia de enfermedades a factores nutricionales (Moghadam et al., 2016; Kelly et al., 2015; Sofi et al., 2016). Actualmente, se ha fijado el interés en la utilización de proteínas de origen vegetal, ya que éstas han reportado menores efecto adverso sobre la salud humana (León et al., 2015; Samaranyaka y Li-Chan, 2011).

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo General*

Evaluar las propiedades tecnofuncionales y biológicas de los hidrolizados de proteína de hoja de yuca (*manihot esculenta crantz*).

1.2.2 *Objetivos Específicos*

- Seleccionar enzimas proteolíticas con mayor grado de hidrólisis sobre las proteínas de hojas de yuca (*manihot esculenta crantz*).
- Establecer las condiciones de operación de la hidrólisis para maximizar el grado de hidrólisis.
- Evaluar *In vitro* las actividades biológicas y tecnofuncionales de los hidrolizados obtenidos a partir de la enzima seleccionada.
- Purificar y secuenciar los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de hojas de yuca (*manihot esculenta crantz*), que presenten actividades biológicas o funcionales.

MARCO TEÓRICO

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Yuca (*manihot esculenta crantz*)

La yuca (*manihot esculenta crantz*) es una planta perenne leñosa, pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, de 2 a 4 m de altura. Su centro de origen genético se encuentra en la cuenca amazónica, siendo unos de los primeros cultivos en ser domesticados, con evidencia de que se cultivó en Perú hace unos 4.000 años y en México hace unos 2.000 años (Anyanwu et al., 2015). Este cultivo fue llevado por los portugueses a África en el siglo XVI y expandido por Indonesia, China, Filipinas, Tailandia y Vietnam (Aristizábal et al., 2007). Es un cultivo de amplia adaptación ya que se siembra desde el nivel del mar hasta los 1.800 msnm, a temperaturas comprendidas entre 20 y 30°C con una óptima de 24°C, una humedad relativa entre 50 y 90 % con una óptima de 72 % y una precipitación anual entre 600 y 3.000 mm con una óptima de 1.500 mm (Aguilera, 2012; Mejia, 2002).

2.1.1 Producción de yuca a nivel mundial y nacional

Para el año 2019, según datos de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), el área sembrada con cultivo de yuca en el mundo fue en promedio de 27,5 millones de hectáreas (ha), que produjeron 303 millones de toneladas (t). Los cinco países con mayor producción fueron: Nigeria, Tailandia, Indonesia, Brasil y República Democrática del Congo. Colombia ocupó el puesto número veinticuatro con 94.247 ha y una producción promedio de 1,02 millones de t (FAO, 2019).

En Colombia, para el 2018, la yuca fue el quinto producto agrario con mayor producción después de la caña de azúcar, el aceite de palma, cereales y arroz. En el periodo 2016-2018, los cultivos de yuca incrementaron en un 16% promedio anual, pasando de 187.184 ha a 219.037 ha

con una producción de 2 millones de t a 2,4 millones de t, respectivamente. Los departamentos con mayor área sembrada son Bolívar, Magdalena, Córdoba, Sucre y Antioquia, que para el 2018, produjeron más de 1,1 millones de t de yuca, es decir el 47,7 % de la producción nacional (Ministerio de agricultura y Desarrollo rural, 2018).

Bolívar, Magdalena, Córdoba y Sucre son departamentos pertenecientes a la Costa Atlántica de Colombia, región donde se cultivan variedades de yuca para consumo humano, que se caracteriza por tener rendimientos promedios de 10,5 t/ha. Además, de variedades de yuca industriales con un rendimiento promedio en el departamento de Sucre y Córdoba de 25 t/ha y variedades de yuca doble propósito, la cual se comercializa en fresco y como materia prima para concentrados para animales (Aguilera, 2012).

La yuca doble propósito concentra su producción en el cuarto y primer trimestre del año, con un 47% y un 31%, de la producción anual, respectivamente. En el segundo trimestre se produce un 15% y en el tercer trimestre la producción solo representa un 7%, siendo la producción poco estacional. La variedad de yuca más sembrada para doble propósito es la Venezolana, con una participación cercana al 29% de la producción a nivel nacional. Del total de la producción de yuca doble propósito, el 69% se destina al mercado de yuca fresca, el 21% al mercado de yuca seca y el 10% al consumo familiar (Alzate, 2009).

2.1.2 *Hojas de yuca*

La planta de yuca tiene como productos primarios las raíces y el follaje. El primero representa el 50 % de la planta. El segundo representa el 10% de la planta siendo consideradas uno de los recursos vegetales con mayor contenido de proteína (FDA, 1997), ya que los aminoácidos esenciales son similares a los encontrados en el huevo de gallina, las hojas de espinaca, soya, avena y arroz (Aguilera, 2012; Latif y Müller, 2015; Ospina y Ceballos, 2002).

Durante el cultivo de yuca, la producción de hojas varía con el período de cosecha, y puede alcanzar aproximadamente dos toneladas de materia seca por hectárea, que son consideradas como desechos agroindustriales o subproductos, es decir, que a nivel mundial se produce aproximadamente 55 millones y a nivel nacional 438 mil t de hojas secas anuales (FAO, 2019; Latif y Müller, 2015; Ministerio de agricultura y Desarrollo rural, 2018; da Silva et al., 2012), teniendo en cuenta un rendimiento de follaje entre 13,7 t/ha y 19,2 t/ha (en base húmeda) en un cultivo con una densidad de 10.000 plantas/ha (CORPOICA et al., 1986), es aproximadamente el mismo rendimiento en términos de material fresco que las raíces (Latif y Müller, 2015) .

Las hojas de yuca, a pesar de tener un buen contenido de proteína, vitaminas y minerales, son de uso limitado debido al alto contenido de fibra y taninos, que no pueden ser digeridos en el estómago de humanos y animales monogástricos. La fibra y los taninos pueden ser eliminados mediante el tratamiento de las hojas con amoníaco, este método resulta efectivo para aumentar el rendimiento de la extracción de proteína y tiene poco efecto sobre el contenido de aminoácidos (Urribarrí et al., 2009). Por otro lado, las hojas de yuca tienen presencia de sustancias tóxicas como los glucósidos cianogénicos (linamarina y lotaustralina), cuyo potencial tóxico depende de la variedad y edad de la planta (Njankouo et al., 2019). Se ha reportado que la hoja de yuca tiene un contenido de cianógenos totales entre 35,9 a 107,5 mg de HCN equivalente/kg peso (Ngudi et al., 2003). La linamarina, que es el compuesto cianogénico más importante, se sintetiza en las hojas mediante N-hidroxilación de valina e isoleucina, mientras la linamarasa es la enzima que cataliza su transformación. Cuando la linamarina y linamarasa interactúan debido al daño mecánico de las células durante la recolección de yuca, se libera acetocianhidrina que se descompone para liberar cianuro, ya sea por hidroxil nitrilo liasa o espontáneamente cuando el pH es superior a 5 (Njankouo et al., 2019).

Por lo tanto, se deben abordar los métodos adecuados de procesamiento de la hoja de yuca antes de su uso para consumo humano (Laya y Koubala, 2020). En el mundo se encuentran numerosas técnicas de procesamiento que disminuyen el potencial cianogénico de la yuca. Los métodos más eficientes son rallar y triturar, en combinación con la humectación, fermentación y

secado, con lo que se puede reducir el contenido de cianuro hasta en un 99%, debido al contacto íntimo en el parénquima húmedo finamente dividido entre la linamarina y la enzima hidrolizante linamarasa, que promueve la rápida descomposición de la linamarina en gas cianuro de hidrógeno que se escapa al aire (Manjula et al., 2020). Bradbury, en 2014 propuso un método para llegar a eliminar hasta el 99% del cianuro total, usando tan solo tres pasos: 1) Macerar 2) secar a 50°C y 3) hacer tres lavados con agua. Por lo que las hojas de yuca, con un adecuado pretratamiento, ofrecen un gran potencial para la extracción o uso de las proteínas.

2.1.3 Aprovechamiento de hojas de yuca

La hoja de yuca ha sido usada para extracción de polifenoles y el estudio de su actividad antioxidante (Laya y Koubala, 2020), la extracción de fitoquímicos con benceno de petróleo para el control de insectos (*Spodoptera litura*) (Manjula et al., 2020), extracción de compuestos en solución acuosa con actividad antiinflamatoria (Tsumbu et al., 2011), extracto rico en flavonoides con actividad antiinflamatoria (Meilawaty y Kusumawardani, 2016) y antioxidante (Chahyadi y Elfahmi, 2020), extracto etanólico con efecto hepatoprotector (Tao et al., 2015), extracto etanólico con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnés* (Mustarichie et al., 2020).

Las hojas de yuca como fuente proteica fueron utilizadas en la formulación de dietas para consumo humano con alto grado de digestibilidad (Giraldo et al., 2008), para mejorar las características nutricionales de los fideos de arroz (Poonsri et al., 2019), dietas para aves sin afectar las características bioquímicas del huevo (Oludare, 2006) y dietas para cerdos (Nguyen et al., 2012). Además, se ha hecho extracción o concentración de proteína de las hojas de yuca mediante: ultrafiltración y termocoagulación ácida (Castellanos et al., 1994), coagulación por reducción de la temperatura, extracción por precipitación isoeléctrica, solubilización y fermentación (Coldebella et al., 2013; da Silva et al., 2012). Sin embargo, es un campo que ha sido poco estudiado y no se ha logrado concentrar la proteína de hojas de yuca por encima de 40%.

2.2 Proteína vegetal de origen foliar

Las proteínas de las hojas se pueden diferenciar entre insolubles y solubles en función de su solubilidad en agua. La mayoría de las proteínas insolubles se encuentran en los cloroplastos, donde aproximadamente la mitad de las proteínas están en el estroma y la otra mitad son parte de las membranas tilacoides, las cuales son redes de membranas que contienen proteínas, lípidos y pigmentos (clorofila y carotenoides) especializados en la fotosíntesis (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020).

La fracción de proteína soluble es predominantemente el rubisco (Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) que puede representar hasta el 50% del total de proteínas solubles en las hojas y es la enzima clave para la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis (Maestri et al., 2016). Las proteínas solubles restantes en las hojas son enzimas involucradas en la síntesis de carbohidratos, lípidos, proteínas y otros compuestos, así como, aminoácidos libres y oligopéptidos (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020).

2.3 Extracción de proteína vegetal de origen foliar

La extracción de proteínas de las hojas no es un concepto nuevo ya que se realizaron muchas investigaciones en este campo durante el siglo XX, especialmente durante la segunda guerra mundial. En ese momento, la posibilidad de utilizar proteínas foliares como alimento humano apareció como una alternativa para brindar a las poblaciones suficiente proteína en caso de escasez de alimentos (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020). La proteína de hojas se ha considerado una fuente de proteína que se puede utilizar en alimentos, piensos para animales o cuando se hidrolizan a aminoácidos para otras aplicaciones (Zhang et al., 2014). Para la extracción de proteína se han estudiado la extracción mediante prensado mecánico (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020), la extracción asistida por enzimas y la extracción alcalina (Shen et al., 2008). Sin

embargo, el rendimiento de extracción de proteínas de hojas es bajo y varía del 15% al 60% de la proteína total, dependiendo de la especie y los métodos de procesamiento (Zhang et al., 2014).

El prensado mecánico se lleva a cabo para separar las proteínas de la hoja de la pared celular de modo que se exprima un jugo rico en proteínas de las fibras. Primero, las hojas frescas se despulpan con diferentes molinos o rodillos para romper las células y liberar los componentes celulares, incluidas las proteínas solubles y los cloroplastos; luego, el jugo se exprime de la pulpa fibrosa presionando (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020). Sin embargo, se ha reportado que solo se realiza una recuperación del 50% de la proteína (King et al., 2012), sugiriendo la utilización de álcalis para aumentar los rendimientos de extracción de proteínas (Sari et al., 2015). En la extracción de proteína asistida por enzimas, se han utilizado proteasas y celulasas. En tal sentido se ha encontrado que las proteasas producen un rendimiento de extracción significativamente mayor (Shen et al., 2008), además, de generar hidrolizados de proteína. Por su lado, la extracción a condiciones alcalinas se emplea tanto para extraer proteínas de recursos vegetales y animales como para modificar las propiedades funcionales de las proteínas. Esta condición aumenta el rendimiento de la extracción de proteínas al descomponer la matriz en la que está contenida y hacer que la proteína sea más soluble en un medio de extracción acuoso (Momen et al., 2021).

2.3.1 Extracción alcalina de proteína vegetal de origen foliar

Este proceso de extracción se realiza ajustando el pH a condiciones alcalinas (pH 8,0-12,0) para solubilizar las proteínas de la harina molida, separando los residuos insolubles (principalmente carbohidratos y otros componentes) de las proteínas solubilizadas por centrifugación y luego aislando las proteínas solubles de otros componentes solubles ajustando el pH en su punto isoelectrico (pH 4-5), seguido de un segundo paso de centrifugación (Momen et al., 2021). El álcali más usado es el NaOH, ya que se utiliza habitualmente en la industria alimentaria, en la extracción de ingredientes ricos en proteínas de fuentes vegetales y animales (Harnedy y FitzGerald, 2013). Usualmente los tratamientos alcalinos se combinan con

tratamientos físicos y químicos, como calentamiento, ultrasonido y reacciones enzimáticas, donde las moléculas de proteína se vuelven más susceptibles a cambios estructurales extensos e irreversibles, que reducen su replegamiento durante el reajuste de las proteínas a pH neutro (Momen et al., 2021).

Hay varios factores que pueden influir en el proceso de extracción de proteína como la temperatura, la relación entre la solución, la materia prima y la concentración de alcali, las cuales han sido estudiadas de forma independiente, pero la interacción de estos tres parámetros ha sido poco investigada (Zhang et al., 2014). Las proteínas de las células vegetales son poco solubles en agua debido a su naturaleza hidrófoba y al enlace disulfuro que contienen, la presencia de sustancias alcalinas ayuda a romper los enlaces de hidrógeno y a disociar el hidrógeno de los grupos sulfato carbónicos, debido al aumento de la carga superficial de las moléculas de proteína generando una mayor solubilidad en agua (Harnedy and FitzGerald, 2013; Shen et al., 2008). Además, el pH alcalino también puede inducir cambios en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas y sus aglomerados. A este pH, las proteínas se despliegan debido a fuerzas extremas de repulsión de carga en las cadenas polipeptídicas, y sus grupos hidrófobos y sulfhidrilo libres (-SH) quedan expuestos (Momen et al., 2021).

La eficacia de las condiciones alcalinas se basa en la descomposición de las paredes celulares o en la descomposición de la proteína entre sí (Santamaría-Fernández and Lübeck, 2020). El álcali altera la pared celular mediante la eliminación parcial de la lignina, altera la composición química y a su vez la estructura de la hemicelulosa (Perović et al., 2020). Por otro lado, las proteínas pueden experimentar otros procesos a pH alcalinos fuertes como reacción de Maillard e hidrólisis (Momen et al., 2021). Durante el proceso de extracción de proteína mediante métodos alcalinos se puede generar hidrolizados de proteína por las concentraciones de álcali y las condiciones de temperatura (Zhang et al., 2014), lo que lleva a una mejora significativa de su solubilidad, capacidad emulsionante, capacidad de espumado, capacidad gelificante y bioactividades (Momen et al., 2021).

2.3.2 *Interacción de compuestos fenólicos durante la extracción de proteína*

Con la extracción alcalina, además de las proteínas, se pueden obtener otros componentes valiosos, como polifenoles, pectina o pigmentos (Zhang et al., 2014). Las proteínas y los polifenoles son dos componentes alimentarios importantes que poseen varios atributos funcionales y nutricionales. Recientemente, la investigación científica en este campo se ha centrado en el desarrollo de péptidos bioactivos derivados de alimentos con énfasis en sus propiedades beneficiosas para la salud en humanos (Zhao et al., 2021).

La interacción entre proteína/péptido y polifenoles protege la proteína/péptido de la oxidación, mejora la estabilidad de las moléculas logrando llegar al objetivo celular, estas interacciones son principalmente hidrofóbicas no covalentes que posteriormente pueden estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno. La unión no covalente es más débil que la unión covalente y siempre es reversible, incluye interacciones hidrofóbicas, de van der Waals, puentes de hidrógeno e iónicas (Lund, 2021). También, puede estabilizarse a enlaces covalentes, dependiendo la capacidad de los fenoles para formar radicales quinonas (Jakobek, 2015), en presencia de oxígeno y solución alcalina, los polifenoles se oxidan a quinonas en primer lugar, luego forman un dímero o reaccionan con la cadena lateral amino o sulfhidrilo de los péptidos, lo que provoca cambios en las estructuras y efectos beneficiosos en los péptidos (Zhao et al., 2021). Lo más probable es que los complejos proteína/péptido – polifenoles no covalentes se hidrolicen en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, el enlace covalente irreversible entre los polifenoles y los residuos de aminoácidos en proteínas que se pueden romper en el tracto gastrointestinal no se ha examinado hasta ahora y necesita más investigación (Ozidal et al., 2013).

Diferentes factores como el tipo de polifenol, el tipo de proteína, el pH y la temperatura pueden influir en la interacción de los polifenoles con las proteínas. Además, diferente hidrofobicidad, punto isoelectrico, composición de aminoácidos y proporción de proteína-

polifenol contribuyen a su afinidad de interacción variable con polifenoles (Li et al., 2021; Zhao et al., 2021). La interacción de proteína/péptido con polifenoles no siempre implica un efecto negativo, hoy en día se promueve la interacción proteína/péptidos - polifenoles con la finalidad de proteger las actividades de los compuestos bioactivos (Lund, 2021). Las partículas de proteína-polifenoles también pueden prolongar el tiempo de retención *in vivo*, mejorar la captación celular y controlar la liberación (Li et al., 2021). Finalmente, la conjugación de proteína/péptidos con polifenoles interactuarán en sinergia para mejorar diversas actividades funcionales (Li et al., 2021; Zhao et al., 2021). Sin embargo, la identificación de péptidos únicos derivados de conjugados rara vez se informa y se discute. Por otro lado, la bioactividad y la estructura, las propiedades funcionales como la actividad emulsionante y de estabilidad de la emulsión de péptidos/proteínas podrían verse influenciadas cuando se conjugan con compuestos fenólicos (Zhao et al., 2021).

2.4 Hidrólisis de proteínas

La reacción de hidrólisis de proteínas consiste en la ruptura de un enlace peptídico por acción del agua, esta reacción puede ser catalizada por álcali o ácido (hidrólisis química) (Zhang et al., 2014), así mismo, por microorganismos proteolíticos (fermentación) (Heffernan et al., 2021) y por enzimas proteolíticas procedentes de diversas fuentes comerciales animales, microbianas y vegetales (hidrólisis enzimática) (da Cruz et al., 2020).

Esta reacción produce cambios en las características moleculares de las proteínas y conlleva a cambios en sus propiedades funcionales (Benítez et al., 2008). Durante la hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

La hidrólisis química es el método menos común de hidrólisis debido al corte inespecífico de los enlaces peptídicos que da como resultado una alta variabilidad en la bioactividad del hidrolizado (Heffernan et al. 2021). La fermentación es el proceso de proteólisis más económico; sin embargo, la hidrólisis enzimática es el método más común para producir hidrolizados de proteínas bioactivas, ya que se pueden seleccionar proteasas y condiciones específicas para producir hidrolizados del tamaño, secuencia y bioactividad deseados (Benítez et al. 2008).

2.4.1 Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis enzimática es la ruptura por la acción de las enzimas proteolíticas que fragmenta las proteínas para convertirlas en cadenas de aminoácidos, llamadas péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010). Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas (Figura 1). Primero, la formación de un complejo enzima-proteína, después la ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido, finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (Benítez et al., 2008).

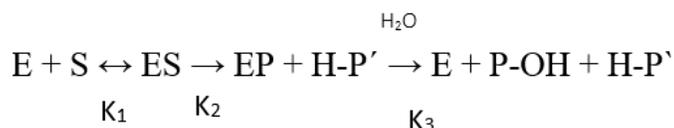


Figura 1 Mecanismo de hidrólisis de una proteasa (Benítez et al. 2008). E: enzima, S: sustrato, P,P': péptidos resultantes, kn: constante de velocidad de reacción.

Durante el proceso de hidrólisis de proteína los factores que afectan el proceso son la enzima, el pH, la temperatura, el tiempo de proceso, la relación enzima/sustrato (E/S) y el tipo de sustrato (Benítez et al., 2008). El proceso de hidrólisis consiste básicamente en

disolver el sustrato en agua, ajustar las condiciones de pH y temperatura según sean las condiciones de la enzima seleccionada y adicionar la proteasa iniciando la hidrólisis. A medida que la reacción es llevada a cabo se produce una disminución del pH debido a la liberación de iones H^+ generados en la ruptura de los enlaces peptídicos. Para detener la reacción, la enzima debe ser inactivada por calor, mediante una disminución del pH, con una combinación de ambos métodos o puede ser separada del medio mediante filtración (Benítez et al., 2008).

2.4.2 Proteasas

Las proteasas pueden clasificarse según su origen en animal, vegetal, bacteriano o fúngico; según su acción catalítica en endopeptidasas o proteinasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas o peptidasas, si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas. Por último, según la naturaleza del sitio catalítico, así las endopeptidasas pueden ser serina-, cisteína-, metalo-, o aspartato-proteinasas y las exopeptidasas amino-, carboxi- o dipeptidasas (Guadix et al., 2000).

Enzimas de origen bacteriano más usadas comúnmente para la liberación de los hidrolizados de proteínas bioactivos incluyen Flavourzyme® (*Aspergillus oryzae*) (Kou et al., 2013; Silveira et al., 2019; Yust et al., 2013), Alcalasa 2,4 L® (*Bacillus licheniformis*) (Chen et al., 2013; Kou et al., 2013; Silveira et al., 2019; Zhang et al., 2010), Neutrasa 0,8L® (*Bacillus amyloliquefaciens*) (Esteve, Marina y García, 2015; Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2016), y Protamex® (*Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*) (Cheung et al., 2012; Esfandi et al., 2019; Tkaczewska et al., 2020) y la combinación secuencial de ellas (Ambigaipalan, Al-Khalifa, y Shahidi, 2015; de Castro, Cason, y Sato, 2017; Marson et al., 2019; Silveira et al., 2019)

Flavourzyme® es una mezcla de enzimas con actividades endo y exopeptidasa, que tiene una amplia especificidad para producir péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos libres. Mientras endopeptidasas como la Alcalasa 2,4L® y la Neutrasa 0,8L® dividen los enlaces peptídicos en el interior de la cadena de polipéptidos liberando péptidos de tamaño pequeños y medianos (de Castro et al., 2017). Por su lado, la Protamex® es una exopeptidasa (Zhou et al., 2016). La hidrólisis enzimática se puede dar por enzimas digestivas en el sistema digestivo humano o por la hidrólisis enzimática *in vitro* (Tkaczewska, 2020). Las hidrólisis *in vitro* usan enzimas comerciales y se realiza comúnmente en reactores. En la Tabla 1 se muestra condiciones de hidrólisis de fuentes vegetales con diferentes enzimas.

Tabla 1. Condiciones del proceso de hidrólisis enzimática *in vitro* de sustratos vegetales con enzimas proteolíticas.

CEREALES Y LEGUMINOSAS			
Recurso vegetal	Enzima	Condiciones	Referencia
Proteína de arroz	Neutrasa	T: 37 °C, pH: 7,0, [S]: 5%, [E/S]: 2/100, t: 4 h	(Zhang et al. 2010)
Sorgo de trigo	Alcalasa	T: 50 °C, pH: 8,0, [S]: 2,5%, [E]: 0,1 %, t: 20-100 min	(Wu et al. 2016)
Proteína de garbanzo	Flavourzyme1000L	T: 50 °C, pH: 7,0, [S]: 5,0%, [E/S]:1,38/1000,	(Yust et al. 2013)
Frijoles rojos	Alcalasa – papaína	T: 50 °C, pH: 7,0, [S]:2,5%, [E/S]:1/8, t: 1,5 h. T: 60 °C, pH: 6,5, [E/S]:1/25, t: 1,5 h	(Ma et al. 2006)
Garbanzo	Alcalasa y flavourzyme	T: 50 °C, pH: 8,0, [S]:5,0%, [E/S]:0,3AU/g, t:1,0 h. T: 50 °C, pH: 7,0, [E/S]:50 LAPAU/g, t: 2,0 h.	(Kou et al. 2013)
Proteína de arroz	Alcalasa y tripsina	T: 55 °C, pH: 9,0, [S]:7,5%, [E/S]:48AU/Kg. T: 25 °C, pH: 7,6, [E]:25 USP.	(Chen et al. 2013)

 CEREALES Y LEGUMINOSAS

Recurso vegetal	Enzima	Condiciones	Referencia
Harina de gluten de maíz	Alcalasa y flavourzyme	T: 50 °C, pH: 7,7, [S]: 10%, [E/S]: 2%, t: 75 min. T: 53 °C, pH: 7,7, [E/S]: 5%, t: 50 min	(Jin et al. 2016)

 HOJAS DE PLANTAS

Recurso vegetal	Enzima	Condiciones	Referencia
Hoja de morera	Tripsina	T: 55°C, pH: 8,5, [E]: 3%, t: 20 min	(Liang et al. 2016)
Hoja de alfalfa	Papaína	T: 50°C, pH: 6,5, [S]: 1%, [E/S]: 1000 U/g.	(Xu, Huang, and Sun 2015)
Hoja de alfalfa	Alcalasa 2,4L	T: 50°C, pH: 9,0, [S]: 3%, [E/S]: 3000 U/g	(Xu et al. 2014)
Hoja e <i>Moringa oleífera</i>	Protamex	T: 30 - 50°C, pH: 8,0 – 10.	(Wang et al. 2015)
Hoja de <i>Cucurbita moschata</i>	Papaína y pepsina	T: 40 - 60°C, pH: 4,5 – 7, t: 2 -6 h.	(Zhang et al. 2015)
Hoja de tabaco	Subtilisina	T: 50 - 60°C, pH: 8,0 – 9,5, [S]: 15 – 20 %, [E]: 0,1 – 0,3 %, t: 2 h	(Parrado, Bautista y Tejada 2012)
Hojas de te	Protamex	T: 50 - 55°C, pH: 7,0 – 7,5, t: 20 – 50 min.	(Wang et al. 2013)
Hojas de yuca	Tripsina y papaína	T: 55 °C, pH: 8,5, [E]: 3% T: 37 °C, pH: 7,6, [E]: 2%	(Manshui et al. 2016)
Hoja de Yaca	Pepsina y pancreatina	T: 37 °C, pH: 2,0, [S]: 1%, [E/S]: 1/100	(Calderón- Chiu et al. 2021)

 CEREALES Y LEGUMINOSAS

Recurso vegetal	Enzima	Condiciones	Referencia
		T: 37 °C, pH: 7,0, [S]: 1%, [E/S]: 1/100	

2.4.3 Medida del grado de hidrólisis

El seguimiento de la hidrólisis enzimática de proteína se realiza mediante el grado de hidrólisis (GH). El cual se define como el número de enlaces peptídicos rotos dividido por el número total de enlaces peptídicos en una proteína (Adler-Nissen, 1986; Guadix et al., 2000; Heffernan et al., 2021). Su determinación se puede hacer por varios métodos, uno de ellos es el método de la valoración del protón o método del pH-stat, que consiste en mantener constante el pH del medio de reacción por la adición de base, para neutralizar los protones que son liberados en la reacción de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986).

El GH se calcula a partir de la cantidad de la base consumida por ensayo pH-stat, siguiendo la ecuación 1:

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} = B \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{Mp} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde B es el consumo de base en ml; Nb es la normalidad de la base; α es el grado medio de disociación de los grupos α -amino (α -NH₂); Mp es la masa de la proteína ($N \times 6.25$) en g; h es los equivalentes de hidrólisis en meqv/g de proteína, y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos en el sustrato de proteína.

Los hidrolizados se han categorizado en tres grupos principales según su grado de hidrólisis que determina su aplicación: (1) hidrolizados con bajo GH y características funcionales mejoradas. (2) hidrolizados con varios GH, generalmente utilizados como aromatizantes e (3) hidrolizados con amplio GH, utilizados principalmente como suplementos nutricionales y en dietas médicas especiales o con actividad biológica (Sarmadi y Ismail, 2010).

2.5 Péptidos con propiedades biológicas *in vitro*

Los péptidos biológicamente activos se definen como fragmentos de proteínas que permanecen inactivos en la secuencia de sus precursores, pero cuando son liberados por enzimas proteolíticas pueden interactuar con receptores apropiados y regular las funciones fisiológicas del organismo, demostrando ser antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, inmunomoduladores de propiedades antiproliferativas, antitrombóticas, anticoagulantes y antihipertensivas (Tkaczewska, 2020). Estos péptidos tienen un tamaño de 2 a 20 aminoácidos y masas moleculares de menos de 6000 Da (Sarmadi y Ismail, 2010b).

Las actividades biológicas pueden verse afectadas por las condiciones operativas aplicadas para aislar proteínas, el grado de hidrólisis, el tipo de proteasa, la estructura del péptido, la secuencia de los aminoácidos, la concentración del péptido y el peso molecular de los péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010a). Sin embargo, la actividad biológica global debe atribuirse a la interacción de los efectos de estas acciones más que a las acciones individuales de los péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010a).

Hasta ahora, de los sustratos de origen vegetal las hojas recibieron la menor atención, posiblemente debido a su contenido de proteína relativamente bajo. Sin embargo, la perspectiva de identificar péptidos antioxidantes de las hojas sigue siendo optimista (Wong et al., 2020). De otras fuentes vegetales como frijol adzuki se han obtenido hidrolizados/péptidos con actividad

antirradical, actividad antihipertensiva y capacidad de quelar iones de hierro e iones de cobre (Durak et al., 2013). González, Marina y García en 2014 a partir de la hidrólisis enzimática de proteína concentrada de semillas de ciruela (*Prunus domestica L.*) obtuvieron péptidos con capacidad de eliminar radicales e inhibir la peroxidación de lípidos, además, alta actividad antihipertensiva. En la Tabla 2 se mencionan otros péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteína de fuente vegetal con actividad biológica.

Tabla 2 Péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteína de origen vegetal con propiedades biológicas.

Fuentes vegetales	Péptidos	Propiedades biológicas	Referencia
Grano de la cebada	EVSLNSGY	Antihipertensiva y antibacterial	(McClellan et al. 2014)
Grano de trigo	GPP, DVWY, FQ, VVG, AY, FY, INSQ, ITF, LF, LGI, PSY, VK, YQY y TLS	Antihipertensiva	(Ma et al. 2006; Maejima et al. 2011; Wu et al. 2016)
Proteínas del maíz	YA, LMCH, CSQAPLA, YPKLAPNE y YPQLLPNE	Antioxidante	(Jin et al. 2016; Tang et al. 2010)
	FRDEHKK y KHDRGDEF	Antioxidante	(Zhang et al. 2010)
Proteínas de arroz	VNP y VWP	Antihipertensiva	(Chen et al. 2013)
	EQRPR	Anticancerígenas	(Kannan et al. 2010)
Frijol rojo	PVNNPQIH	Antihipertensiva	(Ma et al. 2006)

Proteína de garbanzo	NRYHE y RQSHFANAQP	Antioxidantes	(Kou et al. 2013; Zhang et al. 2010)
----------------------	-----------------------	---------------	--

2.6 Actividad antioxidante

Los hidrolizados antioxidantes sirven como ingredientes valiosos en alimentos funcionales considerando su capacidad para extender la vida útil, así como para inducir beneficios para la salud al promover el equilibrio redox celular (Heffernan et al., 2021). Los péptidos antioxidantes al romper la cadena de reacciones de radicales libres, pueden ralentizar la velocidad de los procesos de oxidación enzimáticos y no enzimáticos (Tkaczewska, 2020).

La actividad antioxidante de los hidrolizados/péptidos podría verse influenciada por la secuencia de sus aminoácidos, la cantidad de aminoácidos libres presentes, el grado de hidrólisis y el peso molecular de los péptidos (Ambigaipalan et al., 2015). Los péptidos antioxidantes generalmente se componen de 3-16 residuos de aminoácidos y sus componentes principales son residuos de histidina o tirosina, cisteína, triptófano y lisina (Tkaczewska, 2020).

Los ensayos antioxidantes se pueden realizar de forma *in vitro* no celulares o químicos y en líneas celulares o métodos biológicos (Heffernan et al., 2021; Wen et al., 2020). Los ensayos *in vitro* no celulares para medir la capacidad antioxidante se clasifican en dos grupos: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y métodos basados en la transferencia de electrones (ET) (Sarmadi y Ismail, 2010a). Las pruebas *in vitro* se utilizan a menudo para la investigación preliminar, antes de las pruebas a través de sistemas de modelos *in vivo*, debido a su rentabilidad y capacidad para producir datos rápidos y reproducibles (Heffernan et al., 2021).

Los ensayos antioxidantes *in vitro* en líneas celulares evalúan el potencial para ejercer una respuesta antioxidante a nivel celular (Sayed et al., 2020). El análisis celular es biológicamente más relevante que los ensayos químicos, ya que este método involucra varios aspectos, incluida la captación, distribución y metabolismo celular de compuestos antioxidantes (Wen et al., 2020). Sin embargo, existen algunas desventajas como, que el proceso de cultivo celular puede fácilmente sufrir de contaminación, algunas células tienen un ciclo de crecimiento largo y los experimentos celulares requieren una gran cantidad de reactivos de detección costosos. Además, la mayoría de los experimentos con células utilizan células cultivadas, que no reflejan la situación real en el cuerpo exactamente (Wen et al., 2020).

Los ensayos basados en HAT aplican una reacción competitiva, en la que el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo generados térmicamente. La capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), el parámetro antioxidante de atrapamiento total de radicales (TRAP) y el ensayo de blanqueo de β -caroteno son ejemplos de ensayos basados en HAT (Sarmadi y Ismail, 2010a). Los ensayos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que también actúa como sonda para monitorear la reacción e indicador del punto final de la reacción. La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), el poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP) y la capacidad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) son ejemplos de ensayos basados en ET que se utilizan con frecuencia para medir la actividad antioxidante de los péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010a).

Cabe señalar que no es posible encontrar un único método analítico para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto o mezcla en función de la multiplicidad de mecanismos que pueden ejercer *in vivo*. Se ha recomendado que el mejor método para analizar la actividad antioxidante es utilizar más de un ensayo de base química y celular para evaluar diferentes aspectos de los compuestos hacia las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sayed et al., 2020).

2.6.1 *La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)*

El (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) es un radical protonado que se caracteriza por la disminución de la absorbancia a medida que se elimina el radical protón (Adegbola, Adetutu y Olaniyi, 2020). El ensayo de captación de radicales ABTS mide el potencial de un antioxidante para inhibir la formación de un $\text{ABTS}^{\bullet+}$ coloreado, un cromóforo azul verdoso con absorción característica a 734 nm (Ambigaipalan et al., 2015). Los resultados obtenidos mediante el ensayo TEAC se informan como equivalentes de Trolox.

Los antioxidantes pueden neutralizar el catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ya sea por reducción directa a través de la donación de electrones o por extinción de radicales mediante la donación de átomos de hidrógeno, el equilibrio de estos dos mecanismos generalmente está determinado por la estructura antioxidante y el pH del medio (Shahidi y Zhong, 2015). Por lo tanto, aunque el ensayo TEAC generalmente se clasifica como un método basado en ET, también se aplica el mecanismo HAT.

Este método se puede utilizar para determinar la actividad antioxidante de moléculas tanto lipofílicas como hidrofílicas (Ambigaipalan et al., 2015). $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es un radical monocatiónico soluble en agua (Calderón-Chiu et al., 2021), lo que permite que los hidrolizados disueltos en agua reaccionen más fácilmente con el $\text{ABTS}^{\bullet+}$, lo que sugiere que el ensayo $\text{ABTS}^{\bullet+}$ podría tomarse como el protocolo más apropiado para evaluar la capacidad antioxidante de hidrolizados (Calderón-Chiu et al., 2021).

El ensayo TEAC ha sido cuestionado por su falta de relevancia biológica debido al uso del catión radical ABTS artificial que no se encuentra en los sistemas alimentarios o biológicos. No

obstante, no se puede ignorar la utilidad de estos ensayos para clasificar la actividad antioxidante de sustratos similares en condiciones de prueba comparables (Shahidi y Zhong, 2015).

2.6.2 Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)

El método se basa en la capacidad de la muestra para reducir metales. El principio del método FRAP es que el Fe^{3+} y el cloruro de trifeniltetrazol (TPTZ) pueden formar un complejo en condiciones ácidas. El complejo Fe^{3+} -TPTZ toma un color azul bajo la acción de un antioxidante y el valor de absorbancia de la muestra se puede medir a 593 nm (Wen et al., 2020). A diferencia de otros métodos basados en ET, el ensayo FRAP se lleva a cabo en condiciones de pH ácido (pH 3,6) para mantener la solubilidad del hierro e impulsar la transferencia de electrones. Esto aumentará el potencial redox, provocando un cambio en el mecanismo de reacción dominante (Shahidi y Zhong, 2015).

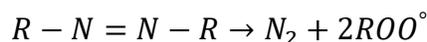
El ensayo FRAP es simple, rápido, rentable y no requiere equipos especializados. Originalmente se empleó para medir el poder reductor en plasma, pero su uso se ha extendido para evaluar la actividad antioxidante en otros fluidos biológicos, alimentos y extractos de plantas (Shahidi y Zhong, 2015). Se ha argumentado el ensayo FRAP, en general, como un método no radical basado en ET y tiene poca correlación con otras mediciones de la actividad antioxidante. Por lo tanto, se sugiere que este ensayo podría usarse en combinación con otros métodos para distinguir los mecanismos dominantes para diferentes antioxidantes (Adegbola et al., 2020).

2.6.3 Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC mide la disminución de la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por radicales peroxilo, los compuestos antioxidantes inhiben la disminución de la fluorescencia y la intensidad podría

medirse a una excitación de 485 nm y una emisión de 525 nm (Ambigaipalan et al., 2015). Un antioxidante estándar, generalmente Trolox, se usa como referencia y los valores ORAC de los antioxidantes probados se informan como equivalentes de Trolox.

Los radicales peroxilo son los radicales libres predominantes que se encuentran en la oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, algunos consideran que los valores de ORAC tienen relevancia biológica como referencia para la eficacia antioxidante (Shahidi y Zhong, 2015). La reacción de generación de radicales peroxilo se simplifica como se indica a continuación:



El azocompuesto dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), por ejemplo, sufre descomposición térmica en presencia de oxígeno para producir radicales peroxilo como oxidantes que reaccionan adicionalmente con la sonda y el antioxidante. La generación de radicales peroxilo es sensible a la temperatura y se ha informado que es uno de los principales factores que interfieren con los resultados y la consistencia del ensayo (Shahidi y Zhong, 2015).

2.6.4 *Quelante de metales*

La propiedad antioxidante de los quelantes de metales se evalúa cuando se forma un complejo entre el antioxidante y el metal, de tal manera que los iones metálicos ya no pueden actuar como iniciadores de la oxidación de lípidos. En sistemas alimenticios, los metales de transición (Fe, Cu, Co) en los alimentos afectan tanto la tasa de autooxidación como la descomposición del hidroperóxido en compuestos volátiles (Ambigaipalan et al., 2015). En el área de la salud, el Fe^{2+} es un ion de metal de transición clave que podría causar la destrucción de biomoléculas, en consecuencia, provocar el inicio de enfermedades en los seres humanos. Por lo

tanto, la quelación de iones de metales de transición por antioxidante o péptido antioxidante evitaría la oxidación (Ambigaipalan et al., 2015). También, La capacidad de quelación de metales se utiliza como indicador de la actividad antioxidante, normalmente en combinación con otros ensayos antioxidantes (Shahidi y Zhong, 2015).

En general, la capacidad de quelación de metales se determina midiendo el efecto quelante de los antioxidantes para los iones ferrosos. El sulfato ferroso y la ferrozina son las fuentes de iones ferrosos más utilizadas. Una pérdida de absorbancia a 485 nm (para sulfato ferroso) o 562 nm (para ferrozina) después de la adición del antioxidante representa la formación de un complejo metal-antioxidante y la capacidad de quelación de metales del antioxidante agregado puede cuantificarse espectrofotométricamente (Ambigaipalan et al., 2015; Shahidi y Zhong, 2015).

2.6.5 *Estrés oxidativo en líneas celulares o ensayo de antioxidantes celulares (CAA)*

Los ensayos *in vitro* en células permiten la detección rápida y económica de compuestos antioxidantes para determinar su biodisponibilidad, metabolismo y bioactividad, en comparación con estudios en animales y ensayos clínicos en humanos que son costosos y requieren de mucho tiempo. El uso de modelos celulares para la investigación de antioxidantes es particularmente importante ya que los estudios hasta la fecha han demostrado que el mecanismo de acción de los antioxidantes en la promoción de la salud humana va más allá de la actividad antioxidante de eliminar los radicales libres (Samaranayaka y Li-Chan, 2011b). Los modelos de cultivo celular también pueden usarse para evaluar la citotoxicidad de compuestos antioxidantes en concentraciones que se usarán para ejercer la bioactividad deseada en el cuerpo, así como para estudiar el potencial para inhibir la oxidación intracelular y reducir las respuestas inflamatorias (Samaranayaka y Li-Chan, 2011b).

La generación incontrolada de radicales libres empeora el desarrollo y la progresión de la diabetes y sus complicaciones. También, se ha sugerido que el estrés oxidativo juega un papel clave en el inicio o el progreso de las complicaciones en pacientes con síndrome metabólico (Sarmadi y Ismail, 2010a). Por tanto, debido a la estrecha relación entre el estrés oxidativo y las enfermedades, el control del estrés oxidativo parece ser uno de los pasos cruciales para frenar el avance de estas enfermedades o prevenir sus complicaciones. Dado que inicialmente no siempre es fácil de medir la actividad antioxidante directamente en animales o humanos, se sugiere que se utilicen modelos celulares para una comprensión más completa de la actividad antioxidante a nivel celular y una mejor correlación con su desempeño *in vivo*. Los modelos de cultivo celular proporcionan un enfoque rentable y relativamente rápido que aborda los problemas de absorción, distribución y metabolismo de compuestos antioxidantes (Wolfe y Rui, 2007).

El ensayo de antioxidantes celulares (CAA) se desarrolló recientemente para medir cuantitativamente la capacidad de los antioxidantes para inhibir la oxidación en las células. El CAA aprovecha tanto los modelos de cultivo celular como los ensayos químicos al introducir una sonda fluorescente especial en las células (Shahidi y Zhong, 2015). La intensidad de la fluorescencia medida es proporcional al nivel de oxidación. Los antioxidantes absorbidos en las células pueden eliminar el radical peroxilo dando como resultado un menor grado de oxidación observado a medida que aumenta la fluorescencia atenuada (Shahidi y Zhong, 2015). El porcentaje de inhibición de la oxidación por antioxidantes se puede calcular como indicador de la actividad antioxidante.

2.7 Purificación de péptidos

Los productos de la hidrólisis de proteína son una mezcla, donde se incluye proteína no hidrolizada, proteína parcialmente hidrolizada, cadena de aminoácidos con diferente longitud, hidrofobicidad y carga neta, además, aminoácidos libres, entre otros. Para evaluar la estructura y

las actividades de los péptidos antioxidantes con mayor precisión, es necesario desarrollar el método de purificación adecuado.

En la actualidad, la tecnología de separación y purificación de péptidos incluye principalmente separación por membranas, técnicas de cromatografía (cromatografía de permeación en gel, GPC; cromatografía en columna de intercambio iónico, IEC; cromatografía líquida de ultra alta presión, UHPLC; cromatografía líquida de interacción hidrófila, HILIC; cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, RP-HPLC y electroforesis capilar, CE) y combinaciones de estas tecnologías (Sridhar, Inbaraj y Chen, 2021).

Mientras la identificación de los péptidos se logra generalmente mediante el uso de técnicas de espectrometría de masa (MS) como la espectrometría de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF MS), el tiempo de vuelo de desionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), la desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de ionización (MALDI-MS), la ionización por electropulverización-espectrometría de masas (ESI-MS), espectrometría de masas por bombardeo atómico (FAB-MS) (Sridhar et al., 2021) y bioinformática (Wen et al., 2020).

2.7.1 *Desalado de hidrolizados*

La masa exacta de péptidos formados se puede analizar con un espectrómetro de masas como MALDI-MS o ESI-MS. El protocolo de obtención de hidrolizados/péptidos implica el uso de sales, los espectrómetros de masas son muy sensibles a estos aditivos e impurezas, por lo que es necesario un procedimiento de desalado que puede ser ultrafiltración, diálisis, extracción en fase sólida (SPE), entre otras (Gómez y Zapata, 2016).

Hoy en día, el método más común es la extracción en fase sólida con materiales de fase reversa (RP) por ejemplo sílice C18 (Jehmlich et al., 2014). Estos materiales son eficaces para retener la mayoría de los péptidos (Fischnaller et al., 2014). En SPE, las moléculas de interés se unen a una superficie de una resina de fase inversa mediante afinidad hidrófoba, mientras que la fracción no unida se separará mediante el lavado con agua y la mezcla de péptidos limpia unida se liberará posteriormente utilizando disolventes orgánicos (Jehmlich et al., 2014). Los productos químicos o sales no deseados se eliminarán de las muestras, mientras que los analitos se enriquecen y limpian de forma simultánea.

2.7.2 *Purificación de hidrolizados por ultrafiltración*

Se ha demostrado que el peso molecular es un factor importante que determina las propiedades bioactivas de los hidrolizados de proteínas (Connolly et al., 2019). Es por esto que uno de los primeros pasos en el proceso de purificación de hidrolizados de proteínas o péptidos suele ser la separación mediante membranas de ultrafiltración. Este proceso implica la permeación y retención de la muestra en un sistema de membrana (Sridhar et al., 2021), se utiliza principalmente para la separación de fracciones de alto y bajo peso molecular (Xu et al., 2021).

Las ventajas de la ultrafiltración es que su operación es simple, de bajo consumo de energía, permite altos rendimientos de producto, alta eficiencia de separación cuidado con el medio ambiente (Sila y Bougatef, 2016; Vollet et al., 2020). Aunque, el tratamiento de ultrafiltración puede mejorar significativamente la actividad antioxidante de los péptidos, esta técnica dificulta la obtención eficiente de productos de alta pureza (Wen et al., 2020). Además, la membrana de ultrafiltración se bloquea fácilmente con materias primas, lo que provoca contaminación y desperdicio de materias primas. Por tanto, los productos de ultrafiltración a menudo necesitan procesos adicionales de purificación (Jayalakshmi, Rajesh y Mohan, 2012).

2.7.3 *Métodos cromatográficos*

La tecnología de separación por cromatografía es el método más común para la purificación de péptidos o hidrolizados de proteínas. El principio de la separación por cromatográfica se basa en la diferencia que existe en las propiedades físicas y químicas de los componentes peptídicos, lo que hace que tengan diferente forma de ser retenidos por la fase estacionaria y su interacción con la fase móvil para lograr el propósito de la separación. Estas técnicas incluyen principalmente cromatografía de permeación en gel (GPC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de fase reversa (RP-HPLC), entre otras (Wen et al., 2020).

Cromatografía de intercambio iónico (IEC) se basa en el principio de la fuerza de la interacción entre la mezcla de péptidos cargados y los grupos de intercambio iónico en la fase estacionaria (Wen et al., 2020). IEC es afectado fácilmente por la fase móvil, pero es difícil separar componentes con cargas similares en comparación con GPC (Wen et al., 2020). Por lo tanto, esta tecnología a menudo se combina con otros métodos de separación para obtener fracciones de péptidos más purificadas.

La cromatografía de permeación en gel (GPC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El efecto de separación de esta tecnología se ve afectado principalmente por el tipo de empaque, el volumen de la columna de cromatografía, entre otros. Este método es ampliamente utilizado para separar proteínas, péptidos y polisacáridos debido a sus ventajas de fácil operación, libre de contaminación y bajo costo (Sila y Bougatef, 2016).

En la cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) la polaridad de la fase móvil es mayor que la de la fase estacionaria. Se basa en el principio de separación por la diferente hidrofobicidad entre la mezcla de péptidos y la fase estacionaria. El componente de péptido hidrófobo débil se

eluye primero, luego se eluye la fracción hidrófoba fuerte. La RP-HPLC generalmente utiliza gel de sílice como fase estacionaria y agua ultrapura, metanol y acetonitrilo como solventes (Wen et al., 2020).

La RP-HPLC se ha utilizado ampliamente para la separación y purificación de péptidos antioxidantes derivados de proteínas vegetales debido a su buena estabilidad, alta eficiencia de separación y amplia aplicabilidad. Cabe señalar, que la eficacia de separación de RP-HPLC está influenciada por muchos factores, como, el pH, el caudal y la temperatura, entre otros (Sridhar et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, las diferentes tecnologías tienen algunas ventajas y desventajas, que dificultan la obtención de componentes peptídicos ideales solo mediante el uso de una sola tecnología. Por lo tanto, la combinación de una variedad de tecnologías de separación puede lograr una clasificación y separación precisas de mezclas de péptidos para obtener péptidos de alta pureza (Sridhar et al., 2021; Wen et al., 2020).

2.8 Secuenciación de péptidos

Después de una serie de protocolos de separación y purificación, es necesario identificar la estructura del péptido. Los métodos comunes para la identificación de péptidos incluyen transducción de ADN, espectrometría de masas (MS) y la bioinformática. Cabe señalar que la MS ha sido ampliamente utilizada en la identificación de secuencias peptídicas debido a su alta eficiencia, sensibilidad y buena reproducibilidad (Wen et al., 2020).

De acuerdo con los diferentes principios del instrumento de espectrómetros de masas, el tipo de espectrómetros de masas incluye principalmente bombardeo de átomos rápidos (FAB), ionización por electropulverización (ESI) y tiempo de vuelo de ionización por desorción láser

asistida por matriz (MALDI-TOF). Entre ellos, ESI y MALDI-TOF/MS son los más utilizados en la identificación de péptidos antioxidantes debido a su alta sensibilidad y bajo límite de detección (Sila y Bougatef, 2016).

La relación de masa a carga (m/z) de las subfracciones de péptidos se obtiene utilizando el espectrómetro de masas y luego se introduce en la base de datos de proteínas en línea para determinar la secuencia de aminoácidos. Si la base de datos de proteínas en línea no contiene información sobre la estructura primaria de la proteína madre, el secuenciador de péptidos se puede utilizar para *de novo* secuenciación de la secuencia de péptidos. Sin embargo, el secuenciador de péptidos no es aplicable para analizar muestras de péptidos de baja pureza. Además, la cromatografía líquida (LC) acoplada con MS/MS también se aplica ampliamente en el análisis de la secuencia de péptidos, incluidos LC-ESI-MS/MS, LC-MALDI-TOF-MS/MS, LC-cuadrupolo TOF-MS/MS, LC-FTICR (resonancia ciclotrónica de iones de transformada de Fourier) -MS/MS, entre otros (Sridhar et al., 2021).

Es bien sabido que la sensibilidad y la precisión de la identificación y cuantificación de proteínas se ven afectadas por muchos factores, incluida la pureza de la muestra, la plataforma de espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) y el sistema de análisis de datos. Las sustancias como sales, detergentes y tampones influyen en la eficacia de la ionización y la calidad de los datos de MS en términos de sensibilidad y rango dinámico (Jehmlich et al., 2014).

2.9 Actividades tecno-funcionales

Como ingrediente esencial en muchos productos alimenticios, las proteínas confieren diferentes características funcionales en los sistemas alimentarios, además, del valor nutricional. Las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados se definen como aquellas propiedades

fisicoquímicas que influyen en el procesamiento y los atributos de calidad final de los sistemas alimentarios. Los ejemplos de propiedades funcionales de las proteínas incluyen solubilidad, gelificante, emulsificante, formación de espuma, absorción de agua y unión de aceite, consistencia y viscosidad, textura, propiedades de unión al sabor y propiedades de unión y encapsulación de compuestos bioactivos (Momen et al., 2021).

Las características funcionales de las proteínas están influenciadas por su estructura, la presencia de otros componentes alimentarios, así como, la naturaleza del entorno en el que se asocian estas proteínas (Momen et al., 2021). Sin embargo, las proteínas vegetales generalmente se reconocen como menos eficientes como agentes emulsionantes, espumantes y gelificantes que muchas proteínas de alimentos de origen animal como la proteína de clara de huevo, la caseína y las proteínas del suero (Momen et al., 2021).

2.9.1 Actividad espumante

Las espumas a base de proteínas están formadas por dispersiones acuosas de proteínas capaces de formar una película delgada y resistente en la interfaz aire/agua, asegurando que se incorporen grandes cantidades de la fase dispersa (aire) y se estabilicen cinéticamente (Omura et al., 2021). Esta capacidad de las proteínas para estar y permanecer en la interfaz es la base de su propiedad de formación de espuma. La espuma es obtenida mediante el batido de los componentes formadores de espuma, como el tensioactivo (proteínas), la fase gaseosa y la líquida (Kumar et al., 2021).

La espuma consiste en gas, generalmente aire; un líquido, generalmente agua y un agente activo en la superficie (proteína), que exhibe alta viscosidad, gran área superficial, gran energía superficial y baja densidad (Omura et al., 2021). Tres pasos consecutivos están involucrados en el

proceso de formación de espuma de proteínas. Primero, las proteínas globulares con alta solubilidad se difunden en la interfaz del aire y el agua, donde se concentran y reducen la tensión superficial. Luego, los polipéptidos de proteínas se despliegan en la interfaz con una reorientación sincrónica donde los restos polares migran hacia el agua. Después, los polipéptidos interactúan entre sí para la formación de una película constante y continua (Figura 2). Esta interacción podría tener éxito mediante la coagulación y desnaturalización de las proteínas para asegurar una mayor estabilidad de la espuma (Kumar et al., 2021).

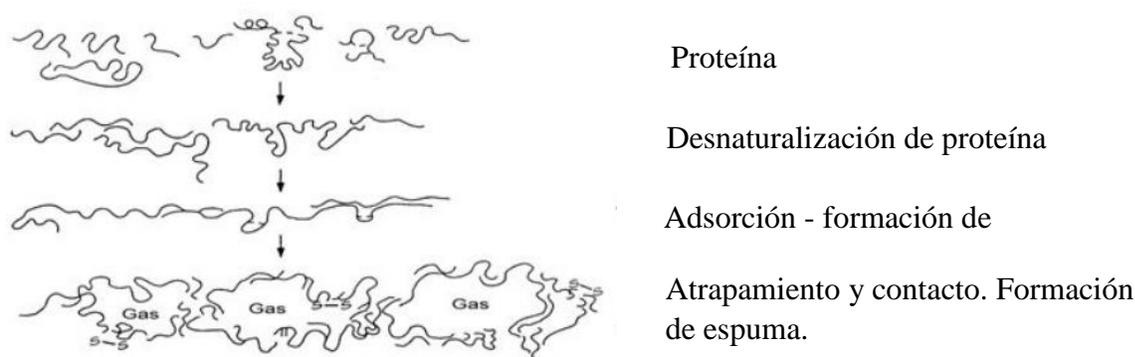


Figura 2 Formación de espuma por proteínas.

El potencial de formación de espuma de una proteína se evalúa con la capacidad espumante, que denota la cantidad inicial de espuma producida después de batir o remover y la estabilidad de la espuma, que denota la cantidad de espuma que se mantiene después de un tiempo específico (Kumar et al., 2021), como se observa en las ecuaciones 2 y 3.

$$CE = \frac{V_1 - V_2}{V_2} \times 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

$$ECE = \frac{V_3 - V_2}{V_2} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde V_1 es el volumen después de batir (mL), V_2 es el volumen antes de batir (mL) y V_3 es el volumen después de reposar (mL).

Tanto la capacidad espumante como la estabilidad de la espuma dependen de la estabilidad interfacial. Un aumento de proteínas hidrófobas y masa molecular aumenta la estabilidad interfacial, lo que conduce a un aumento en la retención de burbujas de aire en suspensión y una reducción en la tasa de coalescencia (Kumar et al., 2021).

Las propiedades de formación de espuma también se ven afectadas por diferentes factores extrínsecos, como el pH, la fuerza iónica y la temperatura. La película interfacial debe ser firme y no debe permitir la liberación de aire atrapado (es decir, debe ser casi impermeable) para formar una espuma fuerte y estable (Omura et al., 2021).

2.9.2 *Actividad emulsificante*

Las emulsiones se definen como una dispersión de dos o más líquidos inmiscibles en la que uno de los líquidos se dispersa en el otro como pequeñas gotas (0,1-100 μm) (Lam y Nickerson, 2013). Por lo general, en la industria alimentaria, las emulsiones son mezclas de aceite en agua (O/W), como en el caso de leche, cremas, aderezos para ensaladas, mayonesa y sopas, o mezclas de agua en aceite (W/O), como en el caso de la margarina y la mantequilla (Kim, Wang y Selomulya, 2020).

Las emulsiones se forman induciendo cizallamiento mecánico a la mezcla, ya sea usando un homogeneizador, un homogeneizador de válvula (alta presión) o mediante burbujeo, para crear pequeñas gotas de un líquido disperso en el otro (Taha et al., 2020). Los emulsionantes actúan para formar películas viscoelásticas alrededor de gotitas dispersas para mantener estables las emulsiones a lo largo del tiempo (Kim et al., 2020).

Los tensioactivos ayudan a estabilizar las emulsiones al disminuir la tasa de formación de crema y coalescencia. Las proteínas actúan como tensioactivos al difundirse rápidamente en la interfaz aceite/agua, donde se reorganizan, interactúan y crean una película de proteína en la superficie de la emulsión (Kumar et al., 2021). Las proteínas también pueden aumentar la estabilidad de la emulsión al aumentar la viscosidad de la fase continua y disminuir la velocidad del movimiento de la gota de aceite a través de la emulsión (Kumar et al., 2021).

Las proteínas son de particular interés en términos de sus propiedades emulsionantes, debido a su naturaleza anfifílica (es decir, que tiene grupos hidrófobos e hidrófilos) y capacidad para formar películas, es por esto por lo que se ha investigado el uso de la hidrólisis parcial de proteínas para mejorar sus propiedades emulsionantes (Lam y Nickerson, 2013).

La hidrólisis parcial se ha utilizado para mejorar las propiedades emulsionantes de la proteína aumentando la solubilidad, revelando grupos hidrofóbicos ocultos, aumentando su hidrofobicidad superficial y reduciendo su peso molecular, lo que permite una mejor adherencia a la interfaz aceite-agua (Lam y Nickerson, 2013). La hidrólisis de proteínas y la mejora asociada en la funcionalidad dependen del grado de hidrólisis donde factores como el tiempo, la temperatura y la enzima seleccionada controlan las características y la funcionalidad del producto resultante (Lam y Nickerson, 2013). Cuando las proteínas están altamente hidrolizadas, la alta concentración de proteína hidrolizada tiende a saturar la fase continua en lugar de adherirse a la interfaz agua-aceite. Esto indica que el uso de la hidrólisis de proteínas para aumentar la funcionalidad se limita a bajos grados de hidrólisis (Lam y Nickerson, 2013).

A valores de DH más bajos, un aumento en el contenido de péptidos con mayor peso molecular aumenta la capacidad emulsionante del hidrolizado de proteína debido a su actividad superficial promueven la emulsión de aceite en agua al proporcionar grupos hidrófilos e hidrófobos. Por otro lado, la hidrólisis excesiva produce péptidos de bajo peso molecular sin

suficiente anfifilicidad para tener buenas propiedades emulsionantes. Los péptidos pequeños se mueven y se absorben rápidamente en la interfaz, pero tienen baja eficiencia para disminuir la tensión de la interfaz, por lo que su despliegue y reorientación en la interfaz para estabilizar las emulsiones es tan restringido, en comparación con los péptidos más largos (Fathollahy et al., 2021).

2.9.3 *Actividades funcionales de proteínas de hoja de yuca*

Pocos estudios se reportan de la evaluación de propiedades tecnofuncionales de proteínas de hoja de yuca, entre los que podemos destacar estudios realizados con la proteína concentrada de hojas de yuca obtenida por precipitación con calor (PCC) y proteína precipitada por ácido (PCA) presentan capacidad de absorción de agua de 667%, 367% y 367% respectivamente; La capacidad de absorción de aceite de 107%, 53% y 48% respectivamente; la estabilidad de la espuma pasado 30 minutos de 78,57%, 46,9%, 0,0%, respectivamente; estabilidad de la emulsión pasado 30 min de 11,5%, 17,0% y 10,0% respectivamente; para la solubilidad del nitrógeno se encontró que a pH de 9, para HHY, fue de 88,73%, mientras que para PCC y PCA a este mismo pH no superó el 20% (Modesti et al., 2007).

Datos un poco contrarios se encontraron para la proteína concentrada de hojas de yuca obtenidas por precipitación por calor. La capacidad de formar emulsión de un 55,4% con una estabilidad del 56,9% (60 min) y para la capacidad de formación de espuma de 4,9%, con una estabilidad del 53% (80 min), la capacidad de absorción de agua de 179% y la capacidad de absorción de aceite de 109,95%, esto demuestra que el tratamiento que se realiza para concentrar las proteínas afecta las características funcionales de las mismas (Aletor, 2010). Hasta donde sabemos, no se han realizado esfuerzos de investigación sobre las propiedades espumantes y emulsificantes de los hidrolizados de hojas de yuca.

METODOLOGÍA

3 METODOLOGÍA

3.1 Reactivos e insumos

Para la hidrólisis enzimática, se utilizó Alcalasa 2,4 L[®] grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Bagsværd-Dinamarca), Flavourzyme 500 L[®], Neutrasa 0,8 L[®], Protamex[®], ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri-2-piridil-s-triazina (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), sal sódica de fluoresceína, Crocin, 2,2'-azobis[2-metilpropionamida], diclorhidrato (AAPH, >98%), Hidrato de sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico (FerroZinaTM), caseína grado técnico, o-ftalaldehído (OPA), Ácido 3-mercaptopropionico, estándar de aminoácidos grado analítico, 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) y Chelex[®] 100 sodio, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis- EE.UU.). Medio Dulbecco's modificado de Eagle's (DMEM + GlutaMAXTM), aminoácidos no esenciales, HEPES, solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina), suero fetal bovino (FBS), buffer fosfato salino (PBS) y solución tripsina-EDTA (2,5 g/L tripsina y 0,2 g/L EDTA), fueron obtenidos de Gibco (Escocia-UK). Metanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético grado HPLC, Folin-Ciocalteu y los medios de cultivo para microbiología fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

3.2 Pretratamiento de hoja de yuca

La materia prima fue la hoja de yuca, la cual fue obtenida de cultivos de yuca de la variedad Venezolana mayor a 6 meses en la etapa de máximo crecimiento, en la cual se lleva a cabo la mayor producción de biomasa (tallos y hojas) y alcanza el mayor índice de área foliar. Las hojas fueron obtenidas en el departamento de Sucre (Colombia), zona de bosque seco tropical, bajo condiciones ambientales que se distribuyen entre los 0-1000 msnm de altitud, presenta temperaturas superiores a los 24 ° C (piso térmico cálido) y precipitaciones entre los 700 y 2000 mm anuales, con uno o dos periodos marcados de sequía al año.

La hoja de yuca fue separada del tallo, descartando las que estaban deterioradas. Luego, fueron sometidas al tratamiento reportado por Tkaczewska et al., en 2020a con algunas modificaciones. Inicialmente, la hoja de yuca fue molida en un procesador de alimentos (Oster, Colombia). 100 g de hoja molida fue mezclada con 1000 mL de agua destilada a 90°C en agitación durante 5 min, luego la hoja fue filtrada a través de un lienzo, este proceso fue realizado tres veces. Luego, las hojas fueron secadas en estufa de aire (Thermofisher, EE. UU.) a 50°C por 6 horas. Las hojas obtenidas del anterior proceso fueron molidas en un procesador de alimentos (NutriBullet, EE. UU.), luego fueron tamizadas para obtener harina con tamaño de partícula de 180 µm, la cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3 Composición proximal

La caracterización fisicoquímica de la harina de hoja de yuca e hidrolizados fue realizado siguiendo los métodos oficiales de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC, 2000). El contenido de humedad se determinó en estufa de aire caliente a 105 °C hasta peso constante según la norma AOAC 930.0. El extracto etéreo se determinó por extracción Soxhlet por 4 horas según la AOAC 930.09. La proteína bruta por el método de Kjeldahl usando el factor 6.25 se determinó según la AOAC 978.04 y el contenido de cenizas se determinó mediante calcinación a 550 °C por 4 horas según la AOAC 930.05. El rendimiento de proteína extraída (E,%) en los tratamientos de extracción e hidrólisis fue calculado como se indica en la ecuación 4 (Benhammouche et al., 2021):

$$E = \frac{\text{g de proteínas soluble en el extracto acuoso}}{\text{g de proteína inicial en la harina de hojas de yuca}} \times 100\%$$

Ecuación 4

La determinación de fibra bruta se realizó utilizando la metodología descrita por Chaiareekitwat et al., en 2022 con algunas modificaciones. 1 g de muestra desengrasada y seca se digirió hirviéndola en ácido sulfúrico 0,13 M durante 30 min, se lavó con agua caliente y se volvió a digerir hirviéndola en hidróxido de sodio 0,31 M durante 30 min. La muestra se lavó con agua caliente hasta alcanzar un pH neutro, para los lavados se usó crisoles de filtración. Luego, se secó a 105 °C durante la noche y finalmente se incineró a 550 °C por 4 horas. La fibra bruta se calculó a partir del peso después del secado restando el peso de la ceniza después de la incineración.

La fibra detergente neutra (FDN) fue medida mediante el método reportado por Soest y Wine en 1967 con algunas modificaciones. Una solución detergente neutra fue preparada mezclando en 1 L de agua destilada 30 g de lauril sulfato de sodio; 18,61 g de dihidrógeno disódico etilendiaminotetraacético dihidrato (EDTA); 6,81 g de borato de sodio decahidratado; 4,56 g de hidrógeno fosfato disódico, anhidro, y 10 ml de 2-etoxietanol (etilenglicol, monoetil éter). El pH debe estar en un rango de 6,9 a 7,1. Posteriormente, se pesó 0,5-1,0 g de harina de hoja de yuca y se mezcló con 100 ml de solución detergente neutra (temperatura ambiente). Se dejó en ebullición por 1 h desde el inicio de la ebullición. La solución se filtró a través de crisoles de filtración, a continuación, se realizó dos lavados con agua caliente (80 – 90 °C). Después, se lavó dos veces con acetona. Los crisoles fueron llevados a estufa a 100 °C durante 8 – 12 h, se enfriaron en desecador y fueron pesados.

La fibra detergente acida (FDA) fue medida mediante el método reportado por Baker en 1977 con algunas modificaciones. Una solución detergente acida fue preparada mezclando 1 L de solución 1 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con 20 g de bromuro de cetil trimetil amonio. Posteriormente, se pesó 0,5-1,0 g de harina de hoja de yuca y se mezcló con 100 ml de solución detergente acida (temperatura ambiente). El procedimiento se siguió igual que para la FDN.

La FDN y FDA se determinaron mediante la siguiente ecuación

$$\% \text{ FDN y FDA} = \frac{\text{Peso del crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{peso de la muestra inicial}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 5}$$

El contenido de lignina fue determinado mediante la metodología reportada por Bunzel, Schübler, y Tchetssebu en 2011 con algunas modificaciones. El residuo obtenido de la FDA fue pesado y transferido a un beaker. Luego, se adicionó una solución de H₂SO₄ al 72% a temperatura ambiente. Se dejó en agitación por 3 h. La solución se filtró a través de crisoles de filtración previamente tardos, a continuación, se realizó lavados con agua caliente hasta pH neutro. Los crisoles fueron secados en estufa a 100 °C durante 8 – 12 h para ser sometidos a mufla a 550 °C por 4 horas. Los crisoles se enfriaron en desecador y fueron pesados. El contenido de lignina se calculó a partir del peso después del secado restando el peso de la ceniza después de la incineración

3.4 Fraccionamiento secuencial de las proteínas de harina de hoja de yuca

La extracción de las diferentes fracciones proteínicas se llevó a cabo en harina desgrasada de hoja de yuca. Para esta extracción se utilizó el método modificado de Osborne reportado por Rosa et al., en 2000 con algunas modificaciones como se describe a continuación. Se realizó una primera extracción suspendiendo harina de hoja de yuca en agua destilada (1:30 p/v) + CaCl₂ 10 mM y MgC₂ 10 mM en tubos de centrifuga cónicos de 50 mL y se agitó por 4 horas a 4 °C y se centrifugó a 9000 g durante 1 hora usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania), recuperando en el sobrenadante la fracción de albúminas. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C hasta su análisis. Posteriormente, se realizó una segunda extracción resuspendiendo el precipitado en una solución de Tris-HCl a pH 8 + NaCl 10 % + EDTA 10 mM, se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 9000 g durante 1 hora, recuperando en el sobrenadante la fracción de globulinas. Se colectó y guardó el sobrenadante a 4 °C hasta su uso. La tercera extracción se realizó resuspendiendo el precipitado en etanol al 75 % y se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 9000

g durante 1 hora recuperando en el sobrenadante la fracción de prolaminas. Se colectó y guardó el sobrenadante a 4 °C hasta su uso. Por último, la cuarta extracción se realizó resuspendiendo el precipitado en una solución de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ pH 10 + β - mercaptoetanol 1% + SDS 1 % (5 mL/g peso seco), se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 9000 g durante 1 hora. Recuperando en el sobrenadante la fracción de glutelinas. Se colectó el sobrenadante y se guardó a 4 °C hasta su uso.

El contenido de proteína de las fracciones aisladas se cuantificó mediante el método de Kjeldahl explicado anteriormente. Se calculó el porcentaje de proteína extraída en cada fracción, utilizando la siguiente relación:

$$\text{Fracción de proteína} = \frac{\text{g de proteína extraída en la fracción}}{\text{g de proteína en la harina}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 6}$$

3.5 Actividad enzimática utilizando caseína como sustrato

La actividad catalítica de la Alcalasa 2,4L[®], Flavourzyme[®], Neutrasa 0,8L[®] y Protamex[®] fue determinada mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por Cheung et al. en 2012. En este análisis, una unidad de actividad es representada por una producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por min a pH 7,5 y 37 °C. Para esto, una alícuota de 100 μL de cada enzima fue incubada con 500 μL de solución de caseína al 0,65 %, durante 10 min a 37 °C. La reacción fue detenida adicionando 500 μL de solución de ácido tricloro acético (110 mM) y la mezcla fue centrifugada a 10000g por 10 min usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania). Luego, 200 μL del sobrenadante fueron tomados y mezclados con 500 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,5 M y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0,5 M. Esta última reacción fue incubada a 37°C por 30 min y la absorbancia fue leída a 660 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermofisher, EE. UU.). Como patrón fue empleada

una curva estándar de solución de tirosina entre 0-200 mg/L. Como control negativo fueron usadas las enzimas inactivas mediante calor a 90°C por 10 min. Los cálculos se realizan como se muestra en las ecuaciones 7 y 8. La actividad enzimática se expresa en unidades/g de proteína.

$$\frac{\text{unidades}}{\text{mL enzima}} = \frac{\mu\text{moles de equivalentes de tirosina liberados} \times V_T}{V_c \times t \times V_E} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\frac{\text{unidades}}{\text{g de proteína}} = \frac{\frac{\text{unidades}}{\text{mL enzima}}}{\frac{\text{g proteína}}{\text{mL enzima}}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde VT es el volumen total del ensayo (mL); Vc es el volumen usado en la determinación colorimétrica (mL); t es el tiempo de reacción de las enzimas (min); VE es el volumen de enzima usado para el ensayo (mL).

3.6 Análisis de aminoácidos

Para determinar la composición de aminoácidos de la harina de hoja de yuca e hidrolizados liofilizados, primero se realizó una hidrólisis en ácido clorhídrico (HCl) 6 N a 110°C durante 6 h. La solución fue llevada a temperatura ambiente y filtrada a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro de 0,22 µm. El análisis cuantitativo de aminoácidos fue realizado por medio de derivatización usando o-ftalaldehído (OPA) para aminoácidos primarios y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) para aminoácidos secundarios, para lo cual, los primeros fueron monitoreados a 338 nm y los segundos a 262 nm. Fue usado cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) o en inglés High Performance Liquid Chromatography (HPLC) serie 1200 sistema binario (Agilent, EE. UU.). La separación fue realizada con una columna Zorbax Eclipse AAA-C18 Analítica, 4,6*150 mm, 5 µm (Agilent, EE. UU.). Las concentraciones de aminoácidos de las muestras fueron calculadas a partir de curvas de calibración realizadas para cada aminoácido (Gómez et al., 2019).

3.7 Determinación de enlaces peptídicos totales (h_{tot})

El parámetro h_{tot} corresponde al número de enlaces peptídicos por gramo de proteína y tiene unidades de meq aminoácidos/g proteína. Este número fue calculado a partir de la composición de aminoácidos como la suma de las concentraciones (mmol de aminoácido/g proteína) de cada aminoácido. Estas concentraciones fueron obtenidas del análisis de aminoácidos, en el que las concentraciones fueron dadas como g por 100 g de proteína (16 g N usando el factor estándar 6.25) (Kulczyk et al., 2016; Xia et al., 2012). Es posible calcular h_{tot} de la concentración de cada aminoácido usando las ecuaciones 9 y 10.

$$h_{tot} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{18} Fi} * (1 + Fi) * 1000 \quad \text{Ecuación 9}$$

$$Fi = \frac{[Ai]}{\sum_{i=1}^{18} [Ai]} * (PM)_i \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde el aminoácido es i , $[Ai]$ es la concentración ($\mu\text{mol/mL}$), $(PM)_i$ es el peso molecular de cada aminoácido i y Fi es la fracción molar del aminoácido i . El h_{tot} fue calculado usando el aminoácido serina, ya que en las reacciones la serina muestra una respuesta muy cercana a la respuesta promedio de aminoácidos.

3.8 Extracción de proteína de hoja de yuca

Una vez caracterizada la harina de hoja de yuca se procedió a la extracción de proteína, cuyo objetivo principal fue estudiar como la extracción de proteínas de hoja de yuca y la actividad biológica se veía influenciada por las condiciones de operación. Para este fin, se utilizó métodos alcalinos y enzimáticos.

Se realizaron extracciones a condiciones según lo indicaba el proveedor. Primero, se llevó a cabo la extracción por medio alcalino de las proteínas de hoja, para luego ser sometidas a hidrólisis con las enzimas Flavourzyme[®], Alcalasa 2,4 L[®], Neutrasa 0,8L[®] y Protamex[®]. Por otro lado, se evaluó la extracción de proteína con estas mismas enzimas directamente sobre la harina de hoja de yuca. Los resultados de eficiencia de extracción de proteína y actividades biológicas fueron comparados para tomar una decisión de cuales tratamiento debían ser estudiados a profundidad.

La elección de estas cuatro enzimas bacterianas se basó en que se han utilizado ampliamente en la industria alimentaria para diversas aplicaciones (Hong et al., 2019). Además, se ha demostrado que son seguras y están disponibles comercialmente sin requerir tratamiento adicional que pueden aumentar los costos de aplicabilidad del proceso a desarrollar (Hong et al. 2019).

3.8.1 Extracción de proteínas mediante método alcalino

La extracción de proteína fue realizada en un reactor de 500 ml con chaqueta de agua conectado a un baño de recirculación (VWR International, EE. UU.) (para mantener la temperatura constante a 60°C, la concentración de sustrato (S, %) utilizada fue de 5% de harina de hoja de yuca, mezclada con solución 1 M en NaOH y homogenizada por 5 min en un procesador de alimentos (Oster, Colombia). Luego se dejó en agitación constante a 350 rpm por 3 horas en una plancha de agitación Corning[™] (Thermo Fisher Scientific Inc, EE. UU.). La solución fue centrifugada usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania) a 9000 g por 10 min para separar el residuo sólido (la parte fibrosa de la hoja) del líquido (proteína soluble), luego el pH fue ajustado a 7 y almacenado a -20 ° C hasta el análisis. La extracción de la proteína se realizó en un montaje como se muestra en la figura 3.

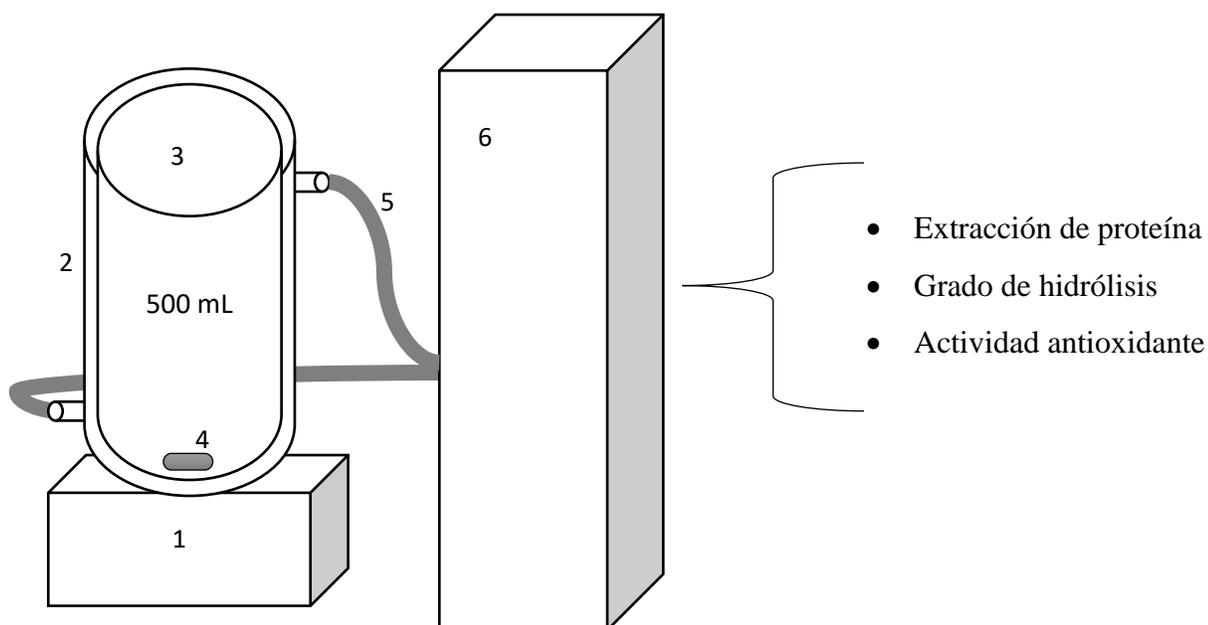


Figura 3 Montaje utilizado para realizar la extracción de proteína mediante método alcalino. 1: Plancha de agitación; 2: Chaqueta de recirculación; 3: Reactor; 4: Agitador magnético; 5: Mangueras recirculación; 6: Baño de calentamiento.

3.9 Hidrólisis enzimática de extracto proteico y harina de hoja de yuca

Al extracto proteico obtenido de la extracción alcalina y la harina de hoja de yuca fueron hidrolizados en un reactor de vidrio con chaqueta de recirculación de agua con control de temperatura y agitación. Para lo cual, una dispersión acuosa del extracto o la harina de hoja de yuca a una concentración de 4 g de proteína/L fue equilibrada a la temperatura y pH de trabajo durante 40 min. El pH fue ajustado con NaOH 0,5 M. Luego, la hidrólisis enzimática fue iniciada con la adición de la enzima, manteniendo la relación enzima sustrato de 0,1 unidades de enzima/g proteína. Las condiciones para cada enzima se muestran en la Tabla 3. El volumen de reacción fue 500 mL, el control de pH y temperatura fueron censados con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrando 842 (Metrohm, Suiza), operado por un ordenador (software Tiamo 1.2.3) por un tiempo de 3 horas. Al final de cada ensayo el medio de reacción fue llevado a 90°C por 10

min para detener la hidrólisis, el hidrolizado fue centrifugado usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania) a 7500 rpm durante 10 min para precipitar la fracción no hidrolizada. Al sobrenadante acuoso recuperado, se le ajustó el pH a 7, para luego liofilizarlo y guardarlo a - 20°C, hasta el análisis. La hidrólisis de la proteína se realizó en un montaje como se muestra en la figura 4.

Tabla 3 condicione de hidrólisis: enzima, temperatura y pH.

Enzima	Temperatura (°C)	pH	Volumen de enzima (mL)
Alcalasa 2,4L [®]	50	9,0	0,521
Neutrasa 0,8L [®]	50	7,0	0,950
Protamex [®]	50	8,0	0,563
Flavourzyme [®]	50	8,0	2,410

3.9.1 Grado de hidrólisis de hidrólisis enzimática

El grado de hidrólisis (DH, %) fue calculado a partir de la cantidad de la base consumida por ensayo pH-stat, siguiendo las ecuaciones 11, 12 y 13 (Adler-Nissen, 1986; Guadix et al., 2000).

$$GH = \frac{h}{h_{TOT}} \times 100\% = B \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{Mp} \times \frac{1}{h_{TOT}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1+10^{pH-pK})} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298-T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad \text{Ecuación 133}$$

Donde B es el consumo de base en mL; Nb es la normalidad de la base; α es el grado medio de disociación de los grupos α -NH₂; Mp es la masa de la proteína (N × 6,25) en g; h los equivalentes de hidrólisis en meqv/g de proteína, y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos en

el sustrato de proteína 7,8 meqv/g de proteína, el cual fue calculado a partir del análisis de aminoácidos, T es la temperatura (K).

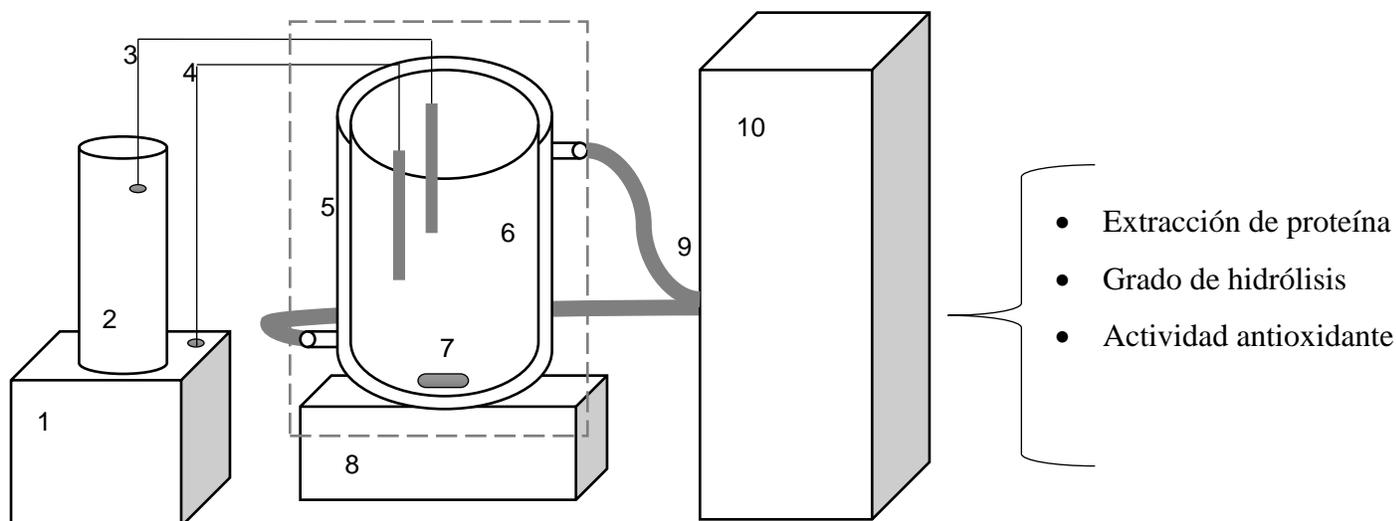


Figura 4 Montaje utilizado para realizar la hidrólisis enzimática. 1: Titrando; 2: NaOH; 3: Dosificador; 4: Electrodo combinado; 5: Chaqueta de recirculación; 6: Reactor; 7: Agitador magnético; 8: Plancha de agitación; 9: Mangueras recirculación; 10: Baño de calentamiento.

3.10 Optimización de condiciones de operación

Para optimizar las condiciones de operación que maximicen la eficiencia de recuperación de proteína y la actividad biológica de los hidrolizados, se realiza un diseño de experimentos para cada proceso seleccionado, tanto para la extracción de proteína de la harina de hoja de yuca mediante álcali y mediante hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4L®.

3.10.1 Optimización de la extracción alcalina de proteína de hoja de yuca

Se realizó un diseño de experimentos central compuesto y fue optimizado mediante la metodología de superficie de respuesta, teniendo como factores concentración de NaOH (NaOH,

0,2 – 1,0 M), temperatura (T, 45 – 55 °C) y concentración de sustrato (S, 6 – 14 %) (Tabla 4). Como variables respuesta se definieron la eficiencia (E, %), proteína (P, %), y actividad antioxidante (FRAP y TEAC, $\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado seco). Todas las extracciones fueron realizadas por un tiempo de 2 horas.

Tabla 4 Corridas experimentales del diseño central compuesto para establecer las condiciones de NaOH, T y S de la extracción de proteína.

Corrida	NaOH (M)	T (° C)	Sustrato (%)
1	1	55	6
2	0,03	50	10
3	0,6	50	4,3
4	1	45	14
5	0,6	57,1	10
6	0,6	50	10
7	0,2	45	6
8	0,6	50	10
9	0,6	42,9	10
10	0,6	50	10
11	0,6	50	10
12	0,2	55	14
13	0,6	50	10
14	1,2	50	10
15	0,6	50	15,6

3.10.2 Optimización de la hidrólisis de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L®

Se desarrolló un diseño experimental del tipo I-optimal, para evaluar el efecto de los factores pH (7,0 – 10), temperatura (T) (40 – 65 °C) y relación enzima/sustrato (E/S) (0,015 – 0,1

%), sobre las variables respuesta, eficiencia de extracción de proteína (E) (%), proteína (P) (g/L) y actividad antioxidante (TEAC) ($\mu\text{mol ET/g}$) (Tabla 5). Todas las hidrólisis fueron realizadas durante 2 horas. Los modelos obtenidos fueron optimizados por medio de la metodología de superficies de respuesta (MRS), utilizando el software Design expert 10[®].

Tabla 5 Corridas experimentales del diseño I-optimal para hidrólisis enzimática de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®].

Corridas	pH	T (°C)	E/S (UE/g proteína)
1	10,0	51,4	0,1
2	7,0	65,0	0,1
3	10,0	40,0	0,1
4	8,8	65,0	0,0
5	10,0	56,1	0,0
6	10,0	65,0	0,1
7	7,0	50,0	0,0
8	7,0	50,0	0,0
9	7,0	40,0	0,1
10	10,0	60,0	0,1
11	8,4	53,4	0,0
12	10,0	56,1	0,0
13	7,3	52,5	0,1
14	8,8	65,0	0,0
15	8,4	53,4	0,0
16	8,8	50,0	0,1
17	8,2	40,0	0,1
18	8,1	40,0	0,0
19	8,8	50,0	0,1
20	7,0	65,0	0,0

3.11 Bioactividades

3.11.1 Actividad antioxidante

A continuación, se explican los métodos que fueron usados para medir la actividad antioxidante en las muestras.

3.11.1.1 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue cuantificado por el método de Folin-Ciocalteu acorde al método colorimétrico adaptado a microplatos de 96 pozos (Canabady-rochelle et al., 2018). 10 μ L de hidrolizado o fracción (2 g/L) fue mezclado con 50 μ L de carbonato de sodio al 3,0 % (w/v) y 150 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N; Sigma Aldrich) a una dilución de 1:15. La absorbancia fue medida a 735 nm usando un lector de placas Varioskan (Thermofisher, EE. UU.). La curva de calibración fue llevada a cabo con una solución estándar de ácido gálico (0, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/L) y el blanco fue realizado con agua ultrapura. El contenido total de compuestos fenólicos fue expresado como mg de ácido gálico/g de hidrolizado.

3.11.1.2 Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)

Fue determinado de acuerdo a Zhou et al. en 2016 con algunas modificaciones, la solución madre de ABTS⁰⁺ fue preparada mezclando una solución 7,4 mM de ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) y solución de persulfato de potasio 2,6 mM, en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4), fueron encubadas en la oscuridad durante 16 h. La solución de ABTS⁰⁺ fresca fue preparada mezclando la solución madre de ABTS⁰⁺ en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4)

para alcanzar la absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Luego, en una microplaca de 96 pozos fue mezclado 20 μL de hidrolizado o buffer fosfato para el control con 180 μL de solución fresca de ABTS^{O^+} , después, la mezcla de reacción fue encubada en oscuridad durante 1 h, la absorbancia se midió a 734 nm con un lector de placas Varioskan (Thermofisher, EE. UU.). Como patrón fue empleada una curva estándar de solución acuosa de Trolox entre 0 – 300 M. Los resultados fueron expresados como μmol equivalente Trolox/g hidrolizado seco ($\mu\text{mol ET/g}$).

3.11.1.3 Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)

La solución FRAP fue preparada en una proporción 1:1:10 de TPTZ (tripiridiltriazina) 10 mM en HCl 40 mM, Cloruro ferrico (III) 20 mM y buffer acetato 0,3 mM, pH 3,6. La solución FRAP fue encubada durante 20 min a 37 °C. En una microplaca de 96 pozos fue adicionado 25 μL de hidrolizado o buffer acetato como control más 175 μL de solución FRAP fresca. Luego, fue incubada durante 30 min a 37 °C, la absorbancia fue medida a 595 nm en un lector de microplacas Varioskan, (Thermofisher, EE.UU.) (Gómez et al., 2019). Como patrón fue empleada una curva estándar de solución acuosa de Trolox entre 0 – 500 M. Los resultados fueron expresados μmol equivalente Trolox/g hidrolizado seco ($\mu\text{mol ET/g}$).

3.11.1.4 Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)

50 μL de hidrolizado o 75 μL de buffer fosfato de sodio 0.075 M pH7 como control fueron mezclados con 50 μL de fluoresceína (78 nM) en una placa negra de 96 pocillos, seguido de incubación a 37 °C durante 15 minutos y 25 μL de Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH) 221 mM fue agregado a la mezcla de reacción. La fluorescencia fue medida cada minuto durante 120 min con un lector de microplacas Varioskan, (Thermofisher, EE.UU.), Ex 485 nm y Em 535 nm. El valor de ORAC fue expresado como $\mu\text{mol ET/g}$ (Urbizo-Reyes et al., 2019).

3.11.1.5 Quelante de calcio o Capacidad de unión al calcio.

Los hidrolizados fueron mezclados hasta una concentración final de 2 g/L con buffer fosfato de sodio (0,2 M, pH 8) con exceso de cloruro de calcio (CaCl₂) 5mM. La solución fue agitada a 200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugada usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania) a 10000g por 10 minutos con el fin de remover las sales de fosfato de calcio insoluble. El contenido de calcio del sobrenadante fue determinado usando un método colorimétrico con el reactivo de complexona orto-cresolftaleína leyendo la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón) (Zhao et al., 2014).

3.11.1.6 Quelante de hierro o ensayo de capacidad de quelación del Fe²⁺

La actividad quelante de Fe²⁺ fue medida según Meiqing et al. en 2018. La mezcla de reacción contenía 1000 µL de solución de hidrolizado (0,5 g/ml), 40 µL de ferrozina al 97%, 20 µL de sulfato ferroso (FeSO₄) 2 mM. La mezcla fue agitada vigorosamente por 10 seg, encubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. La absorbancia fue leída a 565 nm usando un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón). La capacidad de quelante de Fe²⁺ fue calculada utilizando la ecuación 14.

$$\% \text{ quelante de hierro} = \left(\frac{\text{abs blanco} - \text{abs muestra}}{\text{abs blanco}} \right) * 100\% \quad \text{Ecuación 14}$$

El aumento de la autooxidación se correlaciona con el aumento del pH de la solución de reacción (Tkaczewska et al., 2020), por lo que es importante que las mezclas de reacción tengan el mismo pH, en tal sentido, para todos los hidrolizados en este estudio el pH fue ajustado a 7.

3.11.2 Estrés oxidativo en línea celular VSMC A7r5

3.11.2.1 Cultivo celular

Se adquirió una línea celular de músculo liso vascular de aórtica de rata (VSMC) disponible comercialmente como A7r5, de ATCC CRL-1444 (Manassas, VA, USA). Las células fueron usadas entre los pases 3-10, se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con fetal bovine serum (FBS) al 10% y antibióticos al 1% (penicilina-estreptomina y gentamicina) a 37 ° C con 5% de CO₂, hasta que alcanzaron la confluencia del 80%. Las células confluentes fueron puestas en un medio de reposo DMEM + FBS al 1% + antibióticos (Lin et al., 2017).

3.11.2.2 Citotoxicidad

La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo Alamar Blue según Kesavan et al. en 2013. El Alamarblue (sal de sodio de resazurina) (Merck, Alemania) fue disuelto en buffer fosfato pH 7,4 para obtener un stock de 1%. Las células fueron tratadas con hidrolizado completo o sus fracciones, a concentración de 2 mg/ml durante 24 h. Luego, fueron tratadas con alamarblue durante 4 h. El cambio de color fue controlado colorimétricamente a 590 nm mediante el uso de un lector de placas Spectramax M3 (Molecular Devices, California). La viabilidad fue expresada en porcentaje de células viables respecto a un control sin tratamiento con hidrolizado o fracciones.

3.11.2.3 Detección de superóxido

Las células confluentes fueron puestas en un medio en reposo (DMEM + FBS al 1% + antibióticos). Luego, fueron tratadas con 2 mg/mL de hidrolizado o su fracción por 1 h y con 1 μM

de angiotensina II (Ang II) durante 30 min. Posteriormente, fue añadido 20 μ M de dihydroethidium (DHE), seguido de incubación en oscuridad durante 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces con DMEM y la fluorescencia se controló con un microscopio de fluorescencia Olympus IX81, (Olympus Canada Inc., ON, Canadá). Imágenes de tres campos fueron tomadas de forma aleatoria para cada punto de datos. La intensidad de fluorescencia media por célula (MFI/célula) fue determinada en función de la intensidad de fluorescencia total dividida por el número de células. Posteriormente, el cambio fue calculado en base a MFI/célula y fue presentado como porcentaje (%) en base al control no tratado (Lin et al., 2017).

3.12 Ensayo de anticoagulación

Muestras de sangre de 4 voluntarios humanos saludables fueron recogidas en tubos con citrato de sodio (3,2%) y agrupadas. La sangre fue separada por centrifugación usando centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania) a 2800 g durante 15 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Todos los análisis de coagulación fueron realizados usando un analizador de coagulación (GMI, USA) y kits de diagnóstico, siguiendo la metodología descrita por Ktari et al. en 2020 con algunas modificaciones. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los hidrolizados fueron analizados a una concentración de 1 mg/mL y agua destilada como control.

Para el Tiempo de protrombina (PT) fueron adicionados 70 μ L de PPP y 30 μ L de muestra fueron encubados a 37°C por 3 min. Luego, 200 μ L del reactivo PT fueron adicionados y el tiempo de formación del coagulo fue registrado.

Para el Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) 70 μ L de PPP con 30 μ L de la muestra fueron encubados a 37°C por 2 min y 100 μ L del reactivo APTT fueron mezclados e incubado 5 min. El tiempo de coagulación fue registrado inmediatamente después de la adición de 100 μ L de CaCl₂ 25 mM.

3.13 Actividades tecno-funcionales

Las actividades tecno-funcionales fueron medidas al extracto proteico obtenido a condiciones óptimas y al hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] con grados de hidrólisis inferiores obtenidos hasta 1 h de hidrólisis.

3.13.1 Actividad espumante

La capacidad de formación de espuma y la estabilidad de los hidrolizados se determinaron de acuerdo con el método de Calderón-Chiu et al. en 2021 con algunas modificaciones. Se ajustaron 50 mL de solución de muestra al 0,5% a pH 3, 5, 7, 9 y 11, seguido de homogeneización a una velocidad de 16.000 rpm, utilizando un homogeneizador para incorporar el aire durante 2 min a 25°C. La muestra batida se transfirió inmediatamente a un cilindro de 100 ml y se leyó el volumen total después de 30 min. La capacidad de formación de espuma se calculó de acuerdo con las siguientes ecuaciones 15 y 16.

$$CE = \frac{V_1 - V_2}{V_2} \times 100\% \quad \text{Ecuación 15}$$

$$ECE = \frac{V_3 - V_2}{V_2} \times 100\% \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde V_1 es el volumen después de batir (mL), V_2 es el volumen antes de batir (mL) y V_3 es el volumen después de reposar (mL).

3.13.2 Actividad emulsificante

La propiedad emulsionante fue determinada según el método de Calderon, 2021 con pequeñas modificaciones. Fueron mezclados 10 mL de aceite vegetal y 30 mL de solución de proteína al 5 mg/mL. Luego, se ajustó el pH a 3, 5, 7, 9 y 11. La mezcla fue homogeneizada usando un homogeneizador a una velocidad de 16.000 rpm durante 2 min. Se pipeteó 50 μ L de la emulsión del fondo del recipiente a los $t_0 = 0$ y $t_{10} = 10$ minutos después de la homogeneización y se mezcló con 5 ml de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% (Calderón et al., 2021). La absorbancia de la solución diluida fue medida a 500 nm usando un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón). Las absorbancias medidas inmediatamente (A_0) y 10 min (A_{10}) después de la formación de la emulsión se utilizaron para calcular el índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI) como indican las ecuaciones 17 y 18:

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{0,25 \times \text{peso de muestra (g)}} \quad \text{Ecuación 17}$$

$$ESI (\text{min}) = \frac{A_0 \times (t_{10} - t_0)}{(A_0 - A_{10})} \quad \text{Ecuación 18}$$

3.14 Purificación y secuenciación

Se adoptó la estrategia de ultrafiltración para el enriquecimiento de proteínas, la eliminación de contaminantes y fue combinada con proteómica basada LC-MS/MS para la detección de péptidos.

3.14.1 Purificación por ultrafiltración

El hidrolizado obtenido bajo las condiciones óptimas fue fraccionado por peso molecular, por hidrofobicidad y fase reversa en HPLC. Luego, se liofilizaron para llevarlos al ensayo de actividad biológica para estudiar su efecto sobre la bioactividad de las muestras.

Para el fraccionamiento por peso molecular se usaron tubos con membranas de ultrafiltración de celulosa Amicon[®] Ultra (Merck, Alemania) con peso molecular de corte de 3, 10 y 100 kDa, los que se operan en una centrifuga U 320 R (Boeco, Alemania), para obtener cuatro fracciones (F1 > 100 kDa; 10 kDa < F2 < 100 kDa; 3 kDa < F3 < 10 kDa y F4 < 3 kDa) (He et al., 2013).

Primero se pasó por la membrana de 100 kDa, el retenido fue la fracción mayor a 100 kDa (F1) y el filtrado fue pasado por la membrana de 10 kDa; el retenido fue la fracción de 10 – 100 kDa (F2) y el filtrado fue pasado a través de la membrana de 3 kDa; el retenido fue la fracción de 3 – 10 kDa (F3) y el filtrado la fracción menor a 3 kDa (F4). Los retenidos fueron lavados con agua ultrapura seis veces. Todas las muestras fueron liofilizadas y guardadas a – 20°C hasta el análisis.

3.14.2 Purificación por hidrofobicidad

Mientras, que el fraccionamiento por hidrofobicidad se realizó según la metodología descrita por Wang et al. en 2018 mediante una columna de cartucho C18 Sep-Pak[®] Vac, 35 cc (Waters Corporation, EE. UU.), fue dividida en cinco fracciones eluidas con un buffer compuesto por agua Milli-Q (F3-1) y acetonitrilo (ACN), 5 % de ACN (F3-2), 15% de ACN (F3-3), 30% ACN (F3-4) y 60% ACN (F3-5). Cada fracción se rotaevaporó a 45°C, presión de vacío de 500 mm Hg. Todas las muestras fueron liofilizadas y guardadas a – 20° C hasta el análisis.

3.14.3 Métodos cromatográficos

La fracción más activa se sometió a purificación por RP-HPLC usando un sistema de elución binario en una columna C18 Acclaim 120 A° (4.6x250mm, 5 µm, thermofisher, Waltham, MA, EE. UU.); Las fases móviles fueron agua destilada desionizada H₂O (solvente A) y ACN (disolvente B), conteniendo ambos 0,1% de TFA. Las muestras se inyectaron (100 µl) a 20 mg/ml, se eluyeron a 1,0 ml/min mediante una elución en gradiente de 0 a 70% de B en 55 min y 20 min para la segunda purificación, se detectaron a una longitud de onda de 280 nm.

3.14.4 Análisis LC-MS/MS

Las secuencias de péptidos se analizaron a través de un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) de fase inversa nanoAcquity, conectado con una columna Atlantis dC 18 UPLC (75 µm × 150 mm, 3 µm, Waters) y un cuadrupolo de tiempo de vuelo Micromass (Q-TOF) (Fan et al., 2018). La ionización se realizó mediante la técnica de ionización por electropulverización (ESI) en un modo de iones positivos (temperatura de la fuente, 100 ° C; voltaje capilar, 3,4 kV). Las fases móviles fueron LC/MS grado H₂O (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) que contiene ácido fórmico al 0,1%. Se inyectaron muestras (5 µL) y se eluyeron (0,3 ml/min): 1% –60% –95% B (0–2–40–55 min). Los rangos de adquisición fueron *m/z* 300–1300 (modo MS) y 50–1000 (modo MS/MS), respectivamente. Los datos se analizaron mediante el software MassLynx versión 4,1 (Waters Corporation, EE. UU.) mediante secuenciación *de novo*.

3.15 Análisis estadístico

Los diseños experimentales fueron construidos y analizados empleando el software Design- Expert® 8.0.5 (Stat-Ease, EE. UU.). Los análisis de los modelos obtenidos fueron

probados mediante análisis de varianza (ANOVA). La validez de los resultados obtenidos en el modelo estadístico se evaluó de acuerdo con los supuestos de homogeneidad de varianzas, independencia de los errores y normalidad (Montgomery, 2017).

Los resultados de comparación de medias en los análisis de bioactividades fueron evaluados estadísticamente empleando el software Stagraphics® Centurion XV (Virginia, EE. UU.). Los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar de al menos dos replicas. Las diferencias entre las medias se identificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de medias usando la prueba de Duncan con un nivel de significación de 0,05 (95% de confianza) (Montgomery, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de hojas de yuca

El material vegetal recolectado fue tratado como se menciona en la metodología hasta obtener una harina de hoja de yuca. Un análisis fisicoquímico fue realizado a la harina de hoja de yuca, el cual entregó los resultados que se muestran en la Tabla 6, donde se observa que tiene una humedad por debajo del 11% lo que ayuda a que no haya un crecimiento microbiano acelerado y poder conservarla hasta su uso en condiciones de congelación. El contenido de cenizas y extracto etéreo estuvo por debajo de los valores encontrados por Achidi et al. en 2008 y Ayodeji en 2005 con valores entre el 6 -7% para cada uno de estos componentes, respectivamente. Se observa que la proteína de la harina de hoja de yuca evaluada está por encima de los valores reportados por Castellanos et al. en 1994 y Ravindran en 1988 de 17,7%. Mientras, los carbohidratos representan mayor parte de su composición debido a la parte fibrosa, la cual estuvo en el rango reportado por Chaiareekitwat et al. en 2022, con valores entre 10,89 y 16,36%. La fibra detergente neutra y acida estuvieron dentro del rango de 18,1-66,2 % y 9,0-54,6 %, respectivamente, acorde con lo reportado por Latif y Müller en 2015.

Tabla 6 Caracterización fisicoquímica de harina de hoja de yuca variedad venezolana.

Humedad (%)	6,47±0,13
Cenizas (%)	4,87±0,19
Extracto etéreo (%)	5,12±0,08
Proteína (%)	26,73±0,26
Carbohidratos (%)	56,81
Fibra bruta (%)	15,89±1,14
Fibra detergente neutra (%)	48,33±3,39
Fibra detergente acida (%)	41,73±1,07
Lignina (%)	0,69±0,02

En la Tabla 7 se observa los tipos de proteína presentes en la harina de hoja de yuca. La hoja de yuca es rica en nutrientes, la proteína fue el principal componente objetivo de este estudio. El contenido promedio de proteína cruda de la hoja de yuca fue de 26,73%, valor que se encuentra dentro de un rango de 17,7 a 38,1% encontrado para otras variedades de yuca en diferentes etapas de crecimiento (Latif y Müller, 2015). Mientras, que la soja, una planta conocida como fuente de proteína, contiene 39,39–44,54% de proteína cruda (Chaiareekitwat et al., 2022). Las proteínas de hoja de yuca están compuestas en orden descendente de albúmina, globulina, glutelina y prolamina, con una proporción más alta de albuminas (73,21%) y globulinas (18%).

Tabla 7 Tipos de proteína presente en la hoja de yuca variedad venezolana

Tipos de proteínas	(g de tipo de proteína/100 g proteína total)
Albuminas	73,21± 0,63
Globulinas	18,64±ND
Prolaminas	3,11±ND
Glutelinas	5,06±0,38

En la Tabla 8 se observa en contenido de aminoácidos de la hoja de yuca. Los aminoácidos en mayor proporción presentes en la harina de hoja de yuca fueron Tyr, Cit, Glu, Asp, Lys y Ile. Los aminoácidos His, Met, y Lys presentaron valores similares a los reportados por Urribarrí et al. en 2009b para hojas de yuca variedad Tempranita. La presencia de aminoácidos hidrofóbicos como Phe, Ala, Leu en las hojas de yuca indica que es probable encontrar alta actividad antioxidante en los hidrolizados, además, es más probable que sea hidrolizado por enzimas como la Alcalasa 2,4L[®] que prefiere el lado carboxi de los residuos hidrofóbicos (Wu et al., 2016; Xu et al., 2014). Si los aminoácidos Gly, Ala, Ile, Trp, Tyr y Met quedan expuestos durante la hidrólisis pueden aumentar las interacciones hidrofóbicas de los péptidos con agentes oxidantes favoreciendo la actividad antioxidante (Urbizo-Reyes et al., 2019).

Tabla 8 Aminograma de hoja de yuca variedad venezolana

Aminoácidos	Hoja de yuca (g/100 g proteína)
Histidina (His)	3,1
Treonina (Tre)	1,7
Tirosina (Tyr)	22,7
Fenilalanina (Phe)	1,6
Valina (Val)	3,8
Arginina (Arg)	1,2
Metionina (Met)	2,5
Isoleucina (Ile)	6,4
Leucina (Leu)	4,4
Lisina (Lys)	6,1
Ácido Aspártico (Asp)	7,9
Serina (Ser)	1,8
Ácido Glutámico (Glu)	8,8
Asparagina (Asn)	1,6
Glicina (Gly)	1,5
Alanina (Ala)	4,4
Cisteína (Cys)	1,7
Citrulina (Cit)	10,7
AAT	91,8
AAE	53,4
AAH	24,6
AAA	52,6

AAT: aminoácidos totales; AAE: aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Val, His y Arg); AAH: aminoácidos hidrofóbicos (Gly, Ala, Val, Met, Phe, Ile y Leu); AAA aminoácidos antioxidantes (Asp, Glu, Met, Tyr, Phe, His y Lys.)

Los anteriores resultados nos llevan a pensar que las hojas, que generalmente se consideran desechos agrícolas, son muy baratas y se producen ampliamente en muchas partes del mundo

podrían utilizarse como fuente alternativa de proteínas, aunque hace falta hacer estudios de digestibilidad.

4.2 Extracción de proteína de hojas de yuca mediante método alcalino

Primero se llevó a cabo una extracción de proteína usando hidróxido de sodio (NaOH), para obtener un extracto proteico de hoja de yuca. El NaOH puede extraer proteínas al descomponer las interacciones entre ellas, como los enlaces covalentes (enlaces disulfuro intermoleculares) o no covalentes (hidrógeno e hidrófobos) (Braspaiboon et al., 2020). El uso de NaOH de calidad alimentaria se utiliza habitualmente en la industria alimentaria en la extracción de ingredientes con alto contenido de proteínas de fuentes vegetales y musculares. Se utiliza, en la extracción de proteínas de músculo de pescado para la generación de productos a base de surimi y en la generación de aislados de proteína de soja (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

La actividad antioxidante, actividad quelante de metales y actividad anticoagulante fue medida para el extracto proteico de hoja de yuca con el fin de conocer que función biológica era más significativa en el extracto. Además, se midió el grado de hidrólisis del extracto y la eficiencia de extracción de proteína, este último como indicador de viabilidad del proceso. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Recuperación de proteína, grado de hidrólisis y actividad antioxidante de extracto proteico de hojas de yuca.

Extracción	Eficiencia de recuperación de proteína (%)	73,20±0,13
	GH (%)	43,7±0,25
Actividad antioxidante	TEAC (µmol ET/g)	570,03±11,55
	FRAP (µmol ET/g)	283,78±6,08

	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	658,97 \pm 28,04
Actividad quelante de metales	Quelante de hierro (% , 0,5mg/ml)	32,6 \pm 1,6
	Quelante de calcio (% , 2 mg/ml)	2,33 \pm 0,55
Actividad anticoagulante	APTT (1,0 mg/ml) Tiempo (s)	79,7 \pm 0,14
	PT (1,0 mg/ml) Tiempo (s)	12,4 \pm 0,99

Donde GH, grado de hidrólisis; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; ORAC, Capacidad de captación de radicales de oxígeno $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo, APTT, Tiempo de tromboplastina parcial activada; PT, Tiempo de protrombina.

4.3 Hidrólisis enzimática de extracto proteico alcalino de hojas de yuca

Antes de iniciar los tratamientos de hidrólisis enzimática, la actividad proteolítica de las enzimas Alcalasa 2,4L[®]; Neutrassa 0,8L[®]; Flavourzyme[®] y Protamex[®] fue medida con el fin de comparar su actividad por un solo método y poder igualar las unidades enzimáticas para obtener la misma relación enzima:sustrato en las hidrólisis realizadas. La actividad enzimática fue 0,383 \pm 0,006; 0,210 \pm 0,013; 0,083 \pm 0,002 y 0,3551 \pm 0,015 unidades de enzima/ml de producto, para Alcalasa 2,4L[®]; Neutrassa 0,8L[®]; Flavourzyme[®] y Protamex[®], respectivamente. También, se puede expresar como 4,59 \pm 0,07; 6,97 \pm 0,43; 0,80 \pm 0,02 y 6,13 \pm 0,27 unidades de enzima/g de proteína, para Alcalasa 2,4L[®]; Neutrassa 0,8L[®]; Flavourzyme[®] y Protamex[®], respectivamente.

El valor de h_{tot} usado para calcular el GH fue de 7,8 meqv/g de proteína, el cual fue determinado usando como referencia la serina, debido a que este aminoácido muestra una respuesta muy cercana a la respuesta promedio de aminoácidos, ya que el h_{tot} es específico para cada material, depende de la composición de aminoácidos del material crudo (Adler-Nissen, 1986). El valor de h_{tot} fue obtenido según la sección 3.6 para la determinación de enlaces peptídicos totales (h_{tot}) usando las ecuaciones 9 y 10. El h_{tot} encontrado presenta valores cercanos a otros materiales vegetales como la soya negra de 7,8 meqv/g de proteína (Meiqing et al., 2018) y para glutelinas de cebada de 7,93 meqv/g de proteína (Xia et al., 2012).

El extracto proteico de hoja de yuca fue sometido a hidrólisis enzimática para evaluar el efecto que tiene sobre la actividad antioxidante y anticoagulante, como se observa en la Tabla 10. Donde se evidencia que la actividad antioxidante no mejoró con respecto a el extracto proteico, sin embargo, la actividad anticoagulante si aumento. Por otro lado, se puede evidenciar que Flavourzyme[®] y Protamex[®] no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) para TEAC, FRAP y PT. Además, el tratamiento con Alcalasa 2,4L[®] mostro grado de hidrólisis, actividad antioxidante y anticoagulante superiores a las otras enzimas.

Tabla 10 Comparación de la actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de concentrado de proteína con Alcalasa 2,4L[®], Neutrase 0,8L[®], Flavourzyme[®] y Protamex[®].

Enzima	GH (%)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	APTT (1,0 mg/ml) Tiempo (s)	PT (1,0 mg/ml) Tiempo (s)
Alcalasa 2,4L [®]	4,8 \pm 0,10	380,12 \pm 10,82 ^a	152,76 \pm 6,14 ^a	114,90 \pm 0,98 ^a	41,75 \pm 3,72 ^a
Neutrase 0,8L [®]	0,95 \pm 0,08	273,45 \pm 17,85 ^b	99,29 \pm 5,65 ^b	34,20 \pm 0,42 ^b	23,25 \pm 1,48 ^b
Flavourzyme [®]	3,9 \pm 0,24	206,78 \pm 18,05 ^c	82,83 \pm 8,63 ^b	70,30 \pm 3,25 ^c	29,80 \pm 2,26 ^b
Protamex [®]	1,96 \pm 0,04	230,55 \pm 17,24 ^c	92,55 \pm 9,13 ^b	42,60 \pm 1,84 ^d	25,05 \pm 1,06 ^b

Los valores fueron presentados como media \pm DE ($n = 3$). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). GH, grado de hidrólisis; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe^{3+} ; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo. APTT, Tiempo de tromboplastina parcial activada; PT, Tiempo de protrombina

Inicialmente, se realizó hidrólisis con varias enzimas, ya que cada proteasa tiene una especificidad y selectividad diferente, este hecho hace que el producto final de la hidrólisis del extracto de proteína sea variado dependiendo de la enzima, como se puede evidenciar en los resultados obtenidos, incluso utilizando el mismo sustrato de extracto de proteína (Tacias-Pascacio et al., 2020). Esta diferencia entre las acciones de las proteasas puede verse como una ventaja en el sentido de tener una gran variedad de enzimas a elegir para obtener una amplia gama de productos finales a partir de la misma fuente de proteína hidrolizada (Tacias-Pascacio et al., 2020). La hidrólisis de cada proteasa es específica y sus sitios de acción difieren en cada una; en consecuencia, la eficiencia de la hidrólisis varía (Zhou et al., 2016).

4.4 Extracción de proteína mediante hidrólisis enzimática de hoja de yuca

La hidrólisis enzimática de proteínas es un método mayormente utilizado para obtener péptidos bioactivos. En esta sección, la harina de hojas de yuca fue evaluada como sustrato sin realizar una extracción previa de la proteína para estudiar el comportamiento de la eficiencia de extracción de proteína y las actividades biológicas.

En la Tabla 11 se muestra los resultados de la actividad antioxidante (TEAC FRAP, ORAC y ABC) de los hidrolizados de hojas de yuca tratados con las cuatro enzimas en estudio. La actividad antioxidante medida por el método de TEAC, FRAP y ORAC presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) para la Alcalasa 2,4L[®] mostrando mayor actividad que los tratamientos con las otras enzimas. Mientras, TEAC y FRAP para Flavourzyme[®] y Protamex[®] no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Por su lado, Neutrased 0,8L[®] y Protamex[®] no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para la actividad antioxidante medida por el método de ORAC.

Tabla 11 Propiedades de los hidrolizados de hoja de yuca preparados usando Alcalasa 2,4L[®]; Neutrased 0,8L[®]; Flavourzyme[®] y Protamex[®].

Enzima	GH (%)	Eficiencia (%)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
Alcalasa 2,4L [®]	19,03 \pm 0,53 ^a	38,28 \pm 2,85 ^a	622,45 \pm 73,61 ^c	504,47 \pm 17,41 ^b	641,32 \pm 18,44 ^b
Neutrased 0,8L [®]	12,75 \pm 0,38 ^b	26,19 \pm 2,85 ^b	513,04 \pm 48,71 ^b	440,90 \pm 7,32 ^c	273,42 \pm 3,83 ^a
Flavourzyme [®]	26,58 \pm 3,03 ^c	34,25 \pm 2,85 ^c	373,62 \pm 21,79 ^a	299,86 \pm 17,41 ^a	550,42 \pm 32,67 ^c
Protamex [®]	17,81 \pm 1,63 ^a	30,22 \pm 2,85 ^c	425,27 \pm 13,33 ^a	339,93 \pm 34,17 ^a	275,62 \pm 26,06 ^a

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). GH, grado de hidrólisis; Eficiencia, Eficiencia de recuperación de proteína; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígenos, $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo; ABC, Actividad blanqueadora de crocino; % Inh, porcentaje de inhibición.

Al hidrolizar la harina de hoja de yuca con varias enzimas, la Alcalasa 2,4L[®] tuvo una capacidad de extracción de proteínas más alta ($P < 0,05$) que las otras enzimas en el mismo tiempo de hidrólisis, datos similares encontrados para el salvado de arroz hidrolizado con Alcalasa 2,4L[®]; Neutrasa 0,8L[®] y Flavourzyme[®] (Thamnarathip et al., 2016). Esto se puede atribuir a que la Alcalasa 2,4L[®] es una enzima que trabaja a pH alcalinos, lo que hace que haya un efecto de las condiciones alcalinas sobre la extracción que favorecen la recuperación de la proteína.

La harina de varios sustratos ha sido tratada directamente con la enzima buscando favorecer la recuperación de proteína y la obtención de péptidos bioactivos. La harina desengrasada de soya fue tratada con Alcalasa a pH 8 y T 50 °C para obtener hidrolizados con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Vernaza et al., 2012), la harina de salvado de arroz fue hidrolizada por Alcalasa 2,4L[®] (pH 8 y T 50 °C) para obtener péptidos con propiedades antioxidantes (Thamnarathip et al., 2016) y la harina de alga *Palmaria palmata* fue hidrolizada con Alcalasa (pH 8 y T 60 °C) para la recuperación de proteína (Naseri et al., 2020). Este resultado es importante desde una perspectiva industrial, ya que se prevé que el método de extracción enzimática directa (sin aislar la proteína) sea significativamente más susceptible de escalarse porque hay un ahorro energético y de NaOH correspondientes al aislamiento y el secado de la proteína (Ambigaipalan y Al-khalifa, 2015). Sin embargo, se requerirían más estudios detallados centrados en el control del proceso para cuantificar con precisión la magnitud de estas reducciones.

La Neutrasa 0,8L[®] mostró un GH inferior ($p < 0,05$) a la Flavourzyme[®], Protamex[®] y Alcalasa 2,4L[®], ya que siendo una endoproteasa corta las proteínas centrales que son menos asequibles al ataque de la enzima y se hidrolizan más lentamente. Datos similares fueron reportados por Tkaczewska et al. en 2020a en hidrólisis de gelatina de pescado. El GH del 19,03% para la Alcalasa 2,4L[®] se atribuye a que esta enzima es más inespecífica que las otras enzimas en estudio (Tkaczewska et al., 2020). Se informaron resultados similares para los hidrolizados de linaza y cebada (Kulczyk et al., 2016) y para la hidrólisis de glutelinas de cebada (Xia et al., 2012), donde, la Flavourzyme[®] logró un GH mayor en comparación con la Alcalasa 2,4L[®]. Este comportamiento se debe a que la Flavourzyme[®] es una mezcla de enzimas endo y exopeptidasa,

que tiene una especificidad para producir péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos libres. Por otro lado, la Alcalasa 2,4L[®] es una endoproteasa que corta enlaces peptídicos en el interior de las cadenas polipeptídicas, por lo tanto, produce principalmente péptidos de tamaño pequeño y mediano. Mientras, que la Neutrasa 0,8L[®] es una metaloendopeptidasa que preferentemente corta los enlaces cerca del terminal carboxilo entre los aminoácidos hidrófobos, incluidos Leu y Tyr (Zhou et al., 2016).

Las exopeptidasas, rompen los enlaces peptídicos de los aminoácidos terminales (Naseri et al., 2020). Por su parte, las endoproteinasas son peptidasas proteolíticas que rompen los enlaces peptídicos de los aminoácidos no terminales, es decir, no pueden descomponer los péptidos en monómeros. Usar endoproteinasas podría ser mejor para obtener péptidos más grandes después de la extracción de proteínas, ya que no se limitan a los enlaces peptídicos terminales y encuentran una gama mucho más amplia de opciones para los sitios de escisión, también, pueden ser más selectivas (Tacias-Pascacio et al., 2020).

Para los tratamientos de la hoja de yuca con enzimas, se observan valores de TEAC mayores que los encontrados para las enzimas Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme en hidrolizado de semilla de girasol, con valores de 363, 272 y 222 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectivamente (Esteve et al., 2015). En otros estudios con Alcalasa 2,4L[®] se reportaron valores inferiores para TEAC para los hidrolizados de semilla de palma datilera con una actividad de 460 $\mu\text{mol ET Trolox/g}$ (Ambigaipalan y Al-khalifa, 2015). En general, la Alcalasa fue la enzima que mostró mayor actividad antioxidante como se ha demostrado en otros estudios (Esteve et al., 2015; Kulczyk et al., 2016), esto se puede atribuir a que la Alcalasa, siendo una endopeptidasa, es menos específica y puede hidrolizar aminoácidos aromáticos y básicos, tales como Asp, Glu, His, Gly, Lys, Phe, Tyr, Tre y Leu (Zhou et al., 2016).

En la Tabla 12 se observa los resultados para la actividad quelante de hierro que fue mayor para Flavourzyme[®] y Protamex[®] las cuales no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre

sí, seguidas de Alcalasa 2,4L[®] y Neutrasa[®]. La actividad quelante de calcio presentó resultados inferiores a 6,6 %, para todas las enzimas. La actividad anticoagulante de los hidrolizados de hoja de yuca medida con las pruebas APTT fue mayor para el hidrolizado obtenido con la enzima Alcalasa 2,4L[®] seguida de Flavourzyme[®], Protamex[®] y Neutrasa[®], las cuales no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Por su lado, PT no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Tabla 12 Comparación de la actividad quelante de metales y anticoagulante de los hidrolizados de hoja de yuca preparados con Alcalasa 2,4L[®], Neutrasa 0,8L[®], Flavourzyme[®] y Protamex[®].

Enzima	Quelante de hierro (%, 0,5mg/ml)	Quelante de calcio (%, 2 mg/ml)	APTT	PT
			(1,0 mg/ml) Tiempo (s)	(1,0 mg/ml) Tiempo (s)
Alcalasa 2,4L [®]	38,9±0,4 ^a	6,6±1,38 ^{a, b}	55,05 ± 0, 56 ^a	10,60 ± 0,0 ^a
Neutrasa 0,8L [®]	30,2±3,6 ^b	1,8±0,41 ^b	34,00 ± 5,51 ^b	10,95 ± 0,78 ^a
Flavourzyme [®]	48,0±0,26 ^c	4,2±0,96 ^b	40,00 ± 1,27 ^b	11,90 ± 0,14 ^a
Protamex [®]	48,5±0,94 ^c	2,4±0,69 ^a	40,90 ± 0,56 ^b	12,35 ± 0,49 ^a

Los valores fueron presentados como media ± DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). APTT, Tiempo de tromboplastina parcial activada; PT, Tiempo de protrombina.

TTPA y TP son los análisis de sangre comunes para evaluar el riesgo de hemorragia y trombosis. El hidrolizado de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®], el extracto proteico de hoja de yuca y extracto proteico hidrolizado con Alcalasa 2,4L[®] evaluados sin condiciones optimizadas presentaron un aumento significativo en la prolongación del tiempo de coagulación, inhibió el factor de coagulación específico implicado en las vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación, debido a que los sistemas intrínseco y extrínseco de la coagulación no pueden funcionar de manera independiente, ya que todos los factores de coagulación se interrelacionan entre sí (Ho et al., 2020). Datos de TTPA entre 35 y 83, para TP entre 13 y 18 fueron encontrados para fracciones de hidrolizados de proteínas de cebra blenny (Ktari et al., 2020).

La prueba de TP se utiliza para percibir trastornos hemorrágicos y a menudo implica insuficiencia en uno o más de los factores en la vía extrínseca o común de la coagulación de la sangre. Esta insuficiencia puede ser el resultado de trastornos de coagulación hereditarios, escasez de vitamina K, enfermedad hepática o administración de medicamentos. El uso de la prueba de TP es común para examinar la terapia anticoagulante oral porque es sensible a la insuficiencia en los factores II, VII y X1,2 y para la detección preoperatoria general. Sin embargo, la prueba de TP no es sensible a la insuficiencia en el sistema intrínseco de coagulación (es decir, los factores VIII, IX, XI y VII) ni a las disfunciones plaquetarias (Ho et al., 2020), por lo que es necesario realizar prueba TTPA.

La actividad antioxidante y la capacidad quelante de metales tienen una relación estrecha, ya que metales de transición como Cu^{2+} y Fe^{2+} catalizan la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden reaccionar con biomoléculas y deteriorar tejidos biológicos (Canabady-rochelle et al., 2018). Por otro lado, en los sistemas alimentarios la oxidación es catalizada por el hierro y otros metales, como es el caso de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en radicales alcoxilo que son especies reactivas derivadas del oxígeno, que son altamente reactivos, por lo que, la actividad quelante metales de los hidrolizados podría disminuir la oxidación de lípidos, de esta forma contribuir indirectamente a la actividad antioxidante (Shahi, Sayyed-alangi, y Naja, 2020).

La capacidad de los hidrolizados de proteínas como quelantes de hierro, depende del tipo de enzima utilizada, la naturaleza de la proteína inicial y su grado de hidrólisis (Shahi et al., 2020). La actividad quelante de calcio no superó el 20% a la concentración evaluada para los diferentes tratamientos tanto químico como enzimático, pero no se pudo evaluar a concentraciones mayores debido a las interferencias colorimétricas por el color marrón de la muestra. Los hidrolizados de piel de *Cyprinus carpio* realizado con Protamex® presentó actividad quelante de hierro similar a los resultados encontrados en la harina de hoja de yuca variedad Venezolana (Tkaczewska et al., 2020). Mientras, los hidrolizados de hígado de bovino a una concentración 10 veces mayor a la usada (5 mg/ml) encontraron actividades entre 55,6 a 67,4%, aunque en su ensayo trabajaron con cloruro ferroso en lugar de sulfato ferroso (di Bernardini et al., 2011).

El extracto proteico sin ser sometidos a tratamiento con enzima, la hidrólisis sin someter la hoja a una extracción previa y la hidrólisis del extracto proteico con diferentes enzimas fueron comparados con el fin de definir que tratamiento permitía obtener mayor eficiencia de extracción de proteína y mayor actividad biológica. Según los resultados obtenidos, el tratamiento mediante álcali para obtener el extracto proteico y el tratamiento mediante hidrólisis de harina de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] fueron seleccionados para la etapa de optimización donde se continuará evaluando la actividad antioxidante, toda vez que fue la actividad con resultados más prometedores.

La extracción enzimática hace que las proteínas extraídas tengan una mayor solubilidad, el uso de una proteasa conduce a la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en la cadena polipeptídica que forma la proteína y esto mejora significativamente la extracción de proteínas (Tacias-Pascacio et al., 2020). La extracción de proteínas mediante tratamiento con proteasas ha sido más popular que la extracción alcalina (Braspaiboon et al., 2020), esto se debe a que este último método de extracción de proteína presenta inconvenientes como que es un proceso extenso que requiere grandes cantidades de agua y energía, bajo rendimiento proteico de la extracción cuando se requiere alta pureza y el proceso podría alterar la estructura de la proteína nativa (Yang y Sagis, 2021). Sin embargo, en este estudio se quiso estudiar la extracción de proteína mediante métodos alcalinos porque han sido pocos los estudios que han evaluado su efecto sobre la actividad funcionales y biológicas.

4.5 Optimización de la extracción de proteína mediante método alcalino

4.5.1 Efecto de los factores sobre las respuestas en la extracción alcalina de proteínas

El uso de soluciones alcalinas ha sido ampliamente reconocido como un método para la extracción de proteínas de fuentes vegetales. Sin embargo, su eficiencia depende de las

condiciones de extracción como concentración del alcali, temperatura de extracción, tiempo de extracción, la concentración de sustrato (Shen et al., 2008). En este estudio, se utilizó NaOH como único agente de extracción para ver cómo las diferentes condiciones de extracción de proteína y la actividad biológica se veía influenciada por diversas condiciones. Las condiciones del tratamiento para obtener el extracto proteico fueron establecidas mediante el uso del diseño de experimental central compuesto, las corridas experimentales y sus variables respuestas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Corridas experimentales y variables respuesta del diseño central compuesto para establecer las condiciones de NaOH, T y S del tratamiento para obtener el extracto proteico.

Corrida	NaOH (M)	T (° C)	Sustrato (%)	FRAP (µmol ET/g)	TEAC (µmol ET/g)	Eficiencia (%)	Proteína (%)
1	1	55	6	190,37	499,24	50,14	0,83
2	0,03	50	10	1831,64	3537,74	2,60	0,07
3	0,6	50	4,3	290,63	766,78	67,93	0,81
4	1	45	14	243,22	671,36	48,56	1,87
5	0,6	57,1	10	380,20	984,29	57,56	1,58
6	0,6	50	10	380,64	987,33	56,41	1,55
7	0,2	45	6	654,52	1383,07	17,36	0,29
8	0,6	50	10	400,66	1040,22	48,31	1,33
9	0,6	42,9	10	371,91	843,86	31,82	0,87
10	0,6	50	10	319,29	827,55	42,23	1,16
11	0,6	50	10	411,52	1046,47	39,05	1,07
12	0,2	55	14	632,44	1766,06	16,32	0,63
13	0,6	50	10	382,91	1037,64	41,94	1,15
14	1,2	50	10	254,69	666,23	68,56	1,88
15	0,6	50	15,6	476,22	1230,45	28,64	1,23

Donde NaOH, concentración de hidróxido de sodio; M, Molaridad; T, temperatura; °C, centígrados; Eficiencia, Eficiencia de recuperación de proteína; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; µmol ET/g, µmol Equivalente Trolox por gramo.

El diseño experimental fue analizado mediante una ANOVA que se presenta en la Tabla 14, donde se observa los factores y sus interacciones que fueron estadísticamente significativo. La ANOVA señala la significancia de los efectos de cada factor sobre cada una de las respuestas (valor P). Los términos lineales de NaOH y S en su término lineal afectan significativamente la concentración de proteína (P), la eficiencia (E) y la actividad antioxidante (FRAP y TEAC). Por otro lado, T en su término lineal, no presento un efecto significativo.

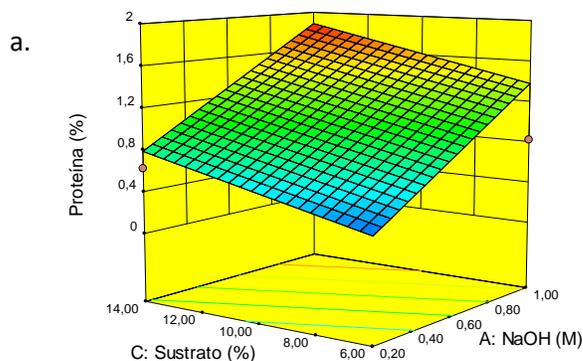
Tabla 14 ANOVA de las variables respuesta del diseño factorial central compuesto en el tratamiento alcalino para obtener extracto proteico de hoja de yuca.

Factores	VALOR p			
	P (%)	E (%)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
Modelo	0,0003	0,0005	< 0,0001	< 0,0001
A-NaOH	0,0002	0,0005	< 0,0001	< 0,0001
B-T	---	---	---	---
C-Sustrato	0,0334	---	0,0282	0,0101
Falta de ajuste	0,1507	0,0951	0,1513	0,1945
R ²	0,7367	0,7340	0,8839	0,8961

P, proteína; E, eficiencia de extracción de proteína; NaOH, concentración de hidróxido de sodio; M, Molaridad; T, temperatura; °C, centígrados; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo.

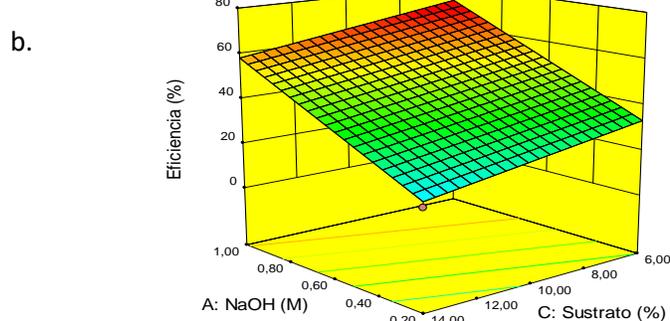
El diseño se optimizo utilizando la metodología de superficie de respuesta para maximizar las variables respuestas. La Figura 5 muestra que alto NaOH y alto S favorecen el contenido de proteína (Figura 5ac), mientras alto NaOH y bajos sustrato favorece la E (Figura 5b), esto se debe a que NaOH favorece la extracción de la proteína por su acción al descomponer la matriz en la que está contenida y hacer que la proteína sea más soluble en un medio de extracción acuoso (Momen et al., 2021). Por otro lado, la actividad antioxidante FRAP y TEAC se ven favorecidas a bajo NaOH y alto S (figura 5c y 5d). Ya que los modelos fueron significativos ($p < 0,05$), el R² para

todas las variables respuestas fueron superiores a 0,7 y la carencia de ajuste no fue significativa, se puede afirmar que los modelos (ecuaciones 19 – 22) expresan razonablemente el comportamiento de las variables respuesta. Dichos modelos fueron sometidos a un proceso de optimización para maximizar las variables respuesta y las condiciones obtenidas fueron evaluadas experimentalmente, para determinar la validez de los modelos.



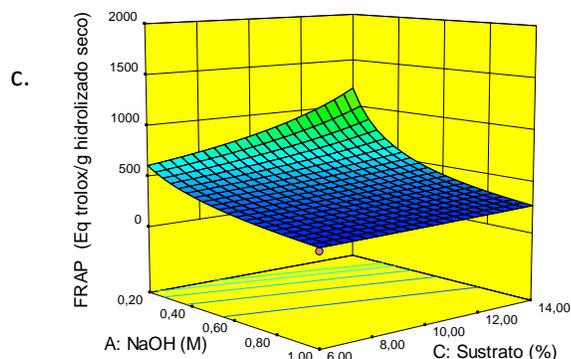
$$\text{Proteína} = -0.34432 + 1.35721 * A + 0.061833 * C$$

Ecuación 19



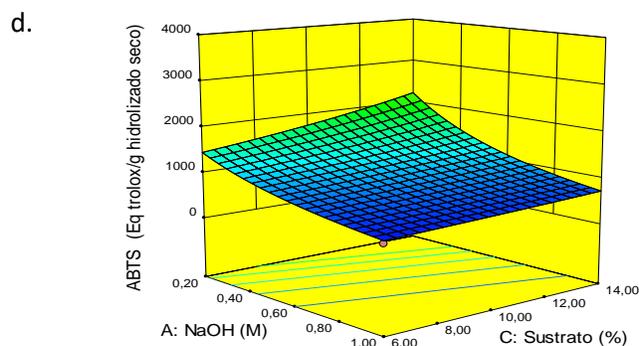
$$\text{Eficiencia} = +11,48 + 49,46 * A$$

Ecuación 17



$$\frac{1}{FRAP} = +1,60352E - 003 + 3,44872E - 003 * A - 9,32616E - 005 * C$$

Ecuación 21



$$1/\text{Sqrt}(TEAC) = +0,026 + 0,020 * A - 6,253E - 004 * C$$

Ecuación 22

Figura 5 Superficies de respuesta para las variables respuesta: a. proteína, b. Eficiencia, c. FRAP y d. TEAC. A, NaOH; B, T; C, Sustrato. NaOH, concentración de hidróxido de sodio; M, Molaridad; T, temperatura; °C, centígrados; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe^{3+} ; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; $\mu\text{mol ET/g}$, $\mu\text{mol Equivalente Trolox por gramo}$.

En la Tabla 15 se observa que los datos experimentales presentaron un error entre 2,9 y 11,5 % respecto a los valores predichos, lo que demuestra la potencia del método de MSR, como estrategia de optimización.

Tabla 15 Respuesta predichas y experimentales del tratamiento alcalino para obtener extracto proteico de hoja de yuca bajo condiciones optimizadas de los factores.

	Optimización			
	Proteína (%)	Eficiencia (%)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
Predicho	1,4	72,84	224,56	559,51
Experimental	1,2 \pm 0,02	74,89 \pm 1,97	234,59 \pm 16,92	593,7 \pm 3,1
Error (%)	11,5	2,9	4,5	6,1

Valores obtenidos a las condiciones optimizadas (concentración de hidróxido de sodio (NaOH): 1 M, temperatura (T): 50°C y sustrato(S): 6%) y presentados como media \pm DE (n = 3). FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; TEAC, Capacidad antioxidante equivalente Trolox; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo.

A las condiciones optimizadas para la extracción alcalina de la proteína de hoja de yuca el rendimiento de extracción fue mayor que le obtenido para hojas de coliflor donde lograron una recuperación del 53,07% (Xu et al., 2017) y para extracto de té con un 50,6 % (Shen et al., 2008) mientras para PHY se logró aproximadamente el 70%. La proteína de semilla de pimentón marrón fue extraída obteniendo una alta concentración de proteína de 78,53% pero el porcentaje de recuperación fue de tan solo 5,23% lo que limita su uso como ingrediente funcional (Mo et al., 2018).

Los rendimientos de la producción de proteínas se reducen durante la recuperación, sin embargo, se ha demostrado que la aplicación de altas temperaturas en la extracción alcalina aumenta el rendimiento de proteínas (Zhang et al., 2014). Por lo anterior, aunque la temperatura no tuvo efecto significativo sobre las variables se escogió trabajar con la temperatura media del diseño. En la extracción de proteínas, la temperatura alta (> 60°C) no es favorable, ya que no solo

puede reducir el rendimiento de proteínas debido a su coagulación y la hidrólisis de proteína, sino que también puede reducir la calidad de las proteínas como resultado de la desnaturalización, hidrólisis o racemización de aminoácidos (Zhang et al., 2014). Por tales razones, se recomienda para un buen porcentaje de recuperación y afectar poco la proteína una temperatura entre 40-60°C (Cui et al., 2017).

4.5.2 Efecto del tiempo en la extracción de proteína mediante método alcalino sobre las variables respuesta

Una vez las condiciones de T, S y NaOH fueron definidas, las variables de eficiencia de extracción de proteína, contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante medida por métodos FRAP, TEAC y quelante de hierro fueron medidas en el tiempo durante un periodo de 6 horas cada hora, los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16 Propiedades del extracto proteico obtenido bajo condiciones optimizadas (T: 50 °C, NaOH: 1M y S: 6%) en función del tiempo.

Tiempo (h)	Eficiencia (%)	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	Quelante de hierro (%)
0	16,0 \pm 3,92 ^a	2,9 \pm 30,12 ^a	156,17 \pm 5,19 ^a	422,749 \pm 9,29 ^a	24,34 \pm 0,93 ^a
1	53,7 \pm 3,9 ^b	4,64 \pm 0,06 ^c	244,79 \pm 19,01 ^b	601,906 \pm 38,43 ^b	16,37 \pm 0,33 ^{a,b}
2	65,2 \pm 4,2 ^c	4,09 \pm 0,16 ^b	274,35 \pm 24,12 ^c	749,392 \pm 43,92 ^c	11,90 \pm 0,63 ^b
3	70,0 \pm 3,6 ^d	4,69 \pm 0,13 ^c	333,57 \pm 24,39 ^d	802,286 \pm 28,79 ^d	17,51 \pm 0,22 ^{a,b}
4	70,75 \pm 8,2 ^d	4,48 \pm 0,07 ^c	369,30 \pm 34,46 ^e	937,348 \pm 29,09 ^e	15,45 \pm 0,53 ^{a,b}
5	72,21 \pm 8,7 ^{d,e}	4,51 \pm 0,14 ^c	385,83 \pm 28,10 ^e	962,287 \pm 64,48 ^e	21,06 \pm 0,72 ^{a,b}
6	76,40 \pm 6,8 ^e	4,66 \pm 0,11 ^c	419,83 \pm 21,74 ^f	990,268 \pm 20,80 ^e	18,68 \pm 0,13 ^{a,b}

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (p<005). TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe 3+; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo.

Se incluyó la medida de compuestos fenólicos porque en el transcurso de los experimentos fue evidente que se estaba extrayendo compuestos fenólicos ya que pudieron haber sido liberados por las condiciones alcalinas durante los tratamientos (Ng et al., 2013).

Se encontró que, en general, era beneficioso un tiempo de extracción más prolongado. El efecto más dramático del tiempo de extracción se observó en las primeras dos horas de extracción, donde el rendimiento de proteína, el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante (FRAP y TEAC), aumentó considerablemente con el tiempo. Después de las 3 horas se presentó aumentos no significativos en la recuperación de la proteína y las actividades biológicas, similar al comportamiento observado en la extracción de proteína de té (Shen et al., 2008). Además, de la concentración de álcali, la temperatura y la concentración de sustrato, el tiempo de extracción, también desempeña un papel importante en la extracción de proteínas de hoja de yuca. De los resultados anteriores se decide continuar trabajando con el extracto proteico de hoja de yuca obtenido a T: 50°C, NaOH: 1M, S: 6% y t: 3h (PHY).

4.6 Optimización de hidrólisis enzimática de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

4.6.1 Efectos de los factores sobre las respuestas en la hidrólisis enzimática de hoja de yuca

Las condiciones de la hidrólisis enzimática usando Alcalasa 2,4L[®] con la harina de hoja de yuca fueron optimizadas mediante un diseño I-optimal del software Design- Expert[®] 8.0.5 (Stat-Ease, EE. UU), que nos permite obtener un diseño sólido estadísticamente mientras se limitan a la menor cantidad de ejecuciones posible. Las corridas experimentales y las variables respuestas se muestran en la Tabla 17, donde los factores fueron pH, T y E/S y las variables respuestas GH, E, P y TEAC. Los resultados revelaron que el GH varió del 8,8 al 22,3%, E entre 27,8 y 47,9%, P entre 1,1 y 11,4 g/L, por último, TEAC entre 1088,8 y 3019,1 $\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado.

Tabla 17 Corridas experimentales del diseño I-optimal con los valores de las variables respuestas de la hidrólisis enzimática de la harina de hojas de yuca con Alcalasa 2,4L®.

Corridas	pH	T (°C)	E/S (UE/g proteína)	GH (%)	Eficiencia (%)	Proteína (g/L)	TEAC (μmol ET/g)
1	10,0	51,4	0,082	18,3	43,9	2,1	1866,1
2	7,0	65,0	0,100	8,8	36,3	1,4	3019,1
3	10,0	40,0	0,069	15,0	47,6	2,7	2049,6
4	8,8	65,0	0,049	13,6	41,5	3,4	1808,4
5	10,0	56,1	0,015	22,3	43,0	11,4	1088,8
6	10,0	65,0	0,100	19,6	32,3	1,3	2021,6
7	7,0	50,0	0,049	13,8	29,2	2,4	2374,7
8	7,0	50,0	0,049	12,9	29,2	2,4	2550,0
9	7,0	40,0	0,100	22,2	28,2	1,1	2970,7
10	10,0	60,0	0,056	13,7	40,0	2,8	2191,4
11	8,4	53,4	0,025	11,4	37,8	5,9	1644,5
12	10,0	56,1	0,015	20,4	38,2	10,1	1790,8
13	7,3	52,5	0,092	12,5	42,2	1,8	2855,1
14	8,8	65,0	0,049	10,8	39,5	3,2	1922,6
15	8,4	53,4	0,025	12,9	29,6	4,7	1802,2
16	8,8	50,0	0,100	21,9	44,3	1,8	1964,0
17	8,2	40,0	0,065	13,5	27,8	1,7	2231,1
18	8,1	40,0	0,015	10,9	30,0	8,0	1710,1
19	8,8	50,0	0,100	18,7	44,3	1,8	2862,2
20	7,0	65,0	0,015	20,4	30,0	8,0	1960,0

T, temperatura; E/S, enzima/sustrato; Eficiencia, eficiencia de extracción de proteína; proteína, proteína soluble, GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente trolox; μmol ET/g, μmol Equivalente Trolox por gramo.

En la Tabla 18 se muestra la ANOVA del diseño experimental, el cual señala la significancia de los efectos de cada factor sobre cada una de las respuestas (valor P). Los términos

lineales de pH y E:S afectan significativamente la concentración de proteína (P), la eficiencia (E) y la actividad antioxidante (AA). Por otro lado, el GH se ve afectado por el pH en su término lineal, la interacción del pH con T y E:S, además, de la interacción de estos dos últimos y por los términos cuadráticos de pH y E:S.

Tabla 18 La ANOVA de las variables respuesta del diseño en la hidrólisis enzimática de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L®.

Factores	<i>Valor p</i>			
	GH (%)	E (%)	P (g/L)	TEAC (μ mol TE/g)
Modelo	0,0003	0,0002	<0,0001	0,0001
A-pH	0,0077	0,0001	0,0015	0,0016
B-T	0,5312	---	---	---
C-E:S	0,1912	0,0107	<0,0001	0,0002
AB	0,0428	---	---	---
AC	0,0434	---	0,0128	---
BC	<0,0001	---	---	---
A2	0,0245	---	---	---
C2	0,0001	---	<0,0001	---
Falta de ajuste	0,27	0,1907	0,3282	0,96
R ²	0,89	0,72	0,96	0,70

Los factores con $p < 0,05$ fueron considerados como significativos. T, temperatura; E/S, enzima/sustrato; E, eficiencia de extracción de proteína; P, proteína; GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; μ mol ET/g, μ mol Equivalente Trolox por gramo.

La Figura 6 muestra que alto pH y bajo E:S favorecen al GH (Figura 6a) y P (Figura 6b), mientras que desfavorecen TEAC (figura 6d). Por su parte E se favorece a altos pH y E:S, esto puede deberse a que la enzima actúa mejor a pH alcalinos y a una interacción por la acción del NaOH que se utiliza para mantener el pH de la reacción. Ya que los modelos fueron significativos

($p < 0,05$), el ajuste para todas las variables respuestas fue superiores a 0,7 y la carencia de ajuste no fue significativa, se puede afirmar que los modelos (ecuaciones 23 – 26) expresan razonablemente el comportamiento de las variables respuesta. Dichos modelos fueron sometidos a un proceso de optimización para maximizar las variables respuesta y las condiciones obtenidas fueron evaluadas experimentalmente, para determinar la validez de los modelos.

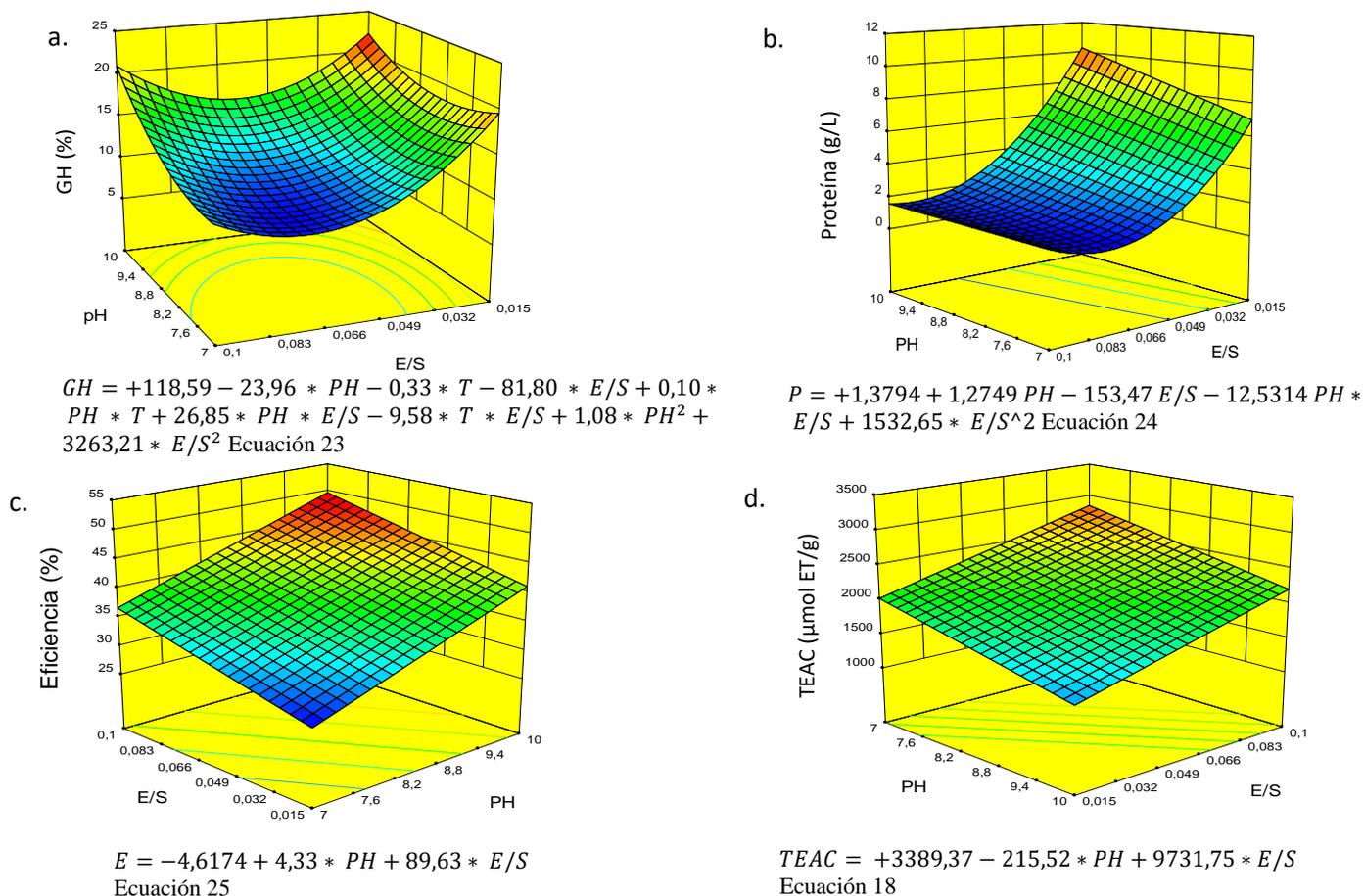


Figura 6 Superficie de respuesta de las variables respuesta: a) GH (%), b) Proteína (g/L), c) Eficiencia (%) y d) TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$). T, temperatura; E/S, enzima/sustrato; E, eficiencia de extracción de proteína; P, proteína; GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; $\mu\text{mol ET/g}$, $\mu\text{mol Equivalente Trolox por gramo}$.

En la Tabla 19 se observa que los datos experimentales presentaron un error entre 1,2 y 9,4 % respecto a los valores predichos, lo que demuestra la potencia del método de MSR, como estrategia de optimización. Así, las condiciones óptimas generadas por MSR fueron validadas para la preparación de hidrolizados de hojas de yuca.

Tabla 19 Respuestas predichas y experimentales de hidrólisis enzimática de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L[®] obtenida bajo condiciones optimizadas de los factores.

	Optimización			
	GH (%)	Eficiencia (%)	Proteína (g/L)	TEAC (μ mol ET/g)
Predicho	22,3	41,1	9,5	1380,2
Experimental	24,4 \pm 0,3	42,1 \pm 0,9	10,3 \pm 0,2	1362,9 \pm 45,5
Error (%)	9,4	2,4	8,4	1,2

Los valores fueron obtenidos bajo los parámetros optimizados (pH: 10, temperature (T): 60,2°C y enzima/sustrato (E/S): 0,015) y presentado como media \pm DE (n = 3). GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; μ mol ET/g, μ mol Equivalente Trolox por gramo.

Las condiciones óptimas arrojadas por MSR fueron pH: 10, T: 60,2 °C y E:S 0,015, unidades de enzima/g proteína, condiciones de pH y T similares a los usados por Gómez et al. en 2019 para hidrólisis de vísceras de tilapia. Mientras, que el pH de 10,32 fue usado para hidrolizar proteína de soja (Tacias-Pascacio et al., 2020), la relación E:S fue inferior a la utilizada para hidrolizar glutelinas de cebada (Xia et al., 2012) y semilla de cereza (González et al., 2014) donde usaron una relación de 0,12 y 0,3 unidades de enzima/g proteína, respectivamente. La Alcalasa puede encontrar una actividad óptima a pH 10, la enzima mantiene su actividad completa a temperatura ambiente en el rango de pH de 5 a 11, con una disminución de la actividad a valores de pH ácidos (Tacias-Pascacio et al., 2020).

El interés por maximizar el GH en se debe a que su incremento ha sido asociado con mayor posibilidad de obtener péptidos bioactivos (Gómez, Figueroa, y Zapata, 2013), como es el caso de capacidad reductora y de captura de radicales (Batista et al., 2010; Gómez et al., 2013). Estos valores elevados de GH implican bajos pesos moleculares de los péptidos, lo cual a su vez ha sido también vinculado con la presencia de actividad biológica (Bourseau et al., 2009; Picot et al., 2010), principalmente cuando los pesos moleculares están entre 1 - 4kDa (de Castro y Sato, 2015; Opheim et al., 2015; Saidi et al., 2014).

El efecto del pH y la temperatura sobre el GH se basa en que estas variables afectan la estructura espacial de la enzima, modificando la exposición de sus sitios activos y con ello, el rompimiento de los enlaces peptídicos en el sustrato (Singh, Siddiqi, y Sogi, 2019). El pH modifica la distribución de cargas y la conformación de las proteínas, por lo que afectan tanto al sustrato como a la enzima (Roslan et al., 2014) y puede modificar la disociación de grupos activos de la enzima, afectando la dinámica de asociación sustrato-enzima (Morales y Figueroa, 2017; Shi, He, y Qi, 2005). En cuanto a la temperatura su efecto se debe a que incrementos de temperatura aumentan la energía cinética en general de las moléculas, en el caso de las enzimas, debido a su naturaleza proteica se ve comprometida su estructura terciaria cuando se alcanzan ciertos valores de temperatura, con posibilidades de desnaturalización térmica, disminuyendo las probabilidades de unión con el sustrato (Noman et al., 2018), lo que conduce a la pérdida de actividad catalítica, cuando se trabaja por encima de un cierto límite de temperatura (Pérez-gálvez et al., 2011; Prieto, Guadix y Guadix, 2008).

En cuanto a la eficiencia de extracción de proteína (E), la figura 6c muestra como los incrementos de pH favorecen E, lo cual ya ha sido reportado (Chomnawang y Yongsawatdigul, 2013), sin embargo, valores muy altos de pH pueden dañar algunos aminoácidos y desnaturalizar las proteínas (Anal y Noomhorm, 2013).

4.6.2 Efecto del tiempo en hidrólisis enzimática de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] sobre las variables respuesta

Con las condiciones optimizadas (pH, T y E/S), se realizó una hidrólisis a la que se hizo un seguimiento durante 6 h, monitoreando las variables respuesta más importantes, las cuales se presentan en la Tabla 20, donde se observa una rápida hidrólisis durante los primeros 120 min, en el rango de 60 min a 120 min se duplica el GH, lo que indica que las cantidades de péptidos aumentan gradualmente durante la hidrólisis.

Tabla 20 Propiedades del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L[®] obtenida bajo condiciones optimizadas en función del tiempo y GH.

Tiempo (h)	GH (%)	Proteína (%)	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
0	0	19,90 \pm 1,49 ^a	152,25 \pm 2,87 ^a	1260,25 \pm 34,79 ^a	1022,75 \pm 49,30 ^{a,c}	1586,68 \pm 47,17 ^a
1	13,29	36,96 \pm 0,37 ^b	154,45 \pm 4,71 ^a	1459,63 \pm 31,46 ^b	982,50 \pm 11,73 ^a	1564,44 \pm 17,55 ^{a,c}
2	24,35	36,35 \pm 0,71 ^b	166,90 \pm 0,98 ^b	2750,88 \pm 76,07 ^c	1141,75 \pm 8,26 ^b	1937,83 \pm 56,22 ^b
4	26,55	40,00 \pm 1,69 ^c	162,03 \pm 4,33 ^b	1405,75 \pm 16,35 ^{b,d}	1074,25 \pm 41,46 ^c	1485,36 \pm 45,06 ^c
6	29,63	40,17 \pm 0,64 ^c	164,40 \pm 5,99 ^b	1375,94 \pm 1,00 ^d	1046,00 \pm 16,47 ^c	1505,26 \pm 29,37 ^c

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). GH, grado de hidrólisis; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígeno; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo.

Se observó una disminución en la velocidad de hidrólisis después de 120 min, lo que puede deberse a limitaciones del sustrato, inactivación de la enzima o inhibición de la enzima (Intarasirisawat et al., 2012). A los 120 min se obtiene la mayor actividad antioxidante correspondiente a un GH de 24,35%, similar a lo encontrado por Xia et al. en 2012. Posteriormente, el GH continúa incrementado hasta llegar de 29,63% a los 360 min. Sin embargo, la actividad antioxidante empieza a disminuir por encima de los 120 min de ensayo, a GH superiores, lo que indica que la actividad antioxidante de los hidrolizados de hoja de yuca no presenta una relación directa con el GH, como fue observado en hidrolizados de huevas de pez listado (Intarasirisawat et al., 2012) e hidrolizados de piel de *Cyprinus carpio* (Tkaczewska et al., 2020). Este comportamiento con incremento hasta un cierto valor y luego disminución en función del GH, también, ha sido observado para la capacidad quelante de hierro de hidrolizados de gelatina (Wu et al. 2017) y de piel de abadejo de Alaska (Guo et al. 2013). GH cercano a 24% fue encontrado en la hidrólisis de proteína de arveja (Olagunju et al., 2018) e inferior para hidrolizados de residuos de cebada de cerveza (Marson et al., 2019).

El efecto del tiempo sobre la actividad antioxidante se explica desde el punto de vista que a medida que se presenta el cambio en la estructura molecular de las proteínas y la liberación de los péptidos, así como, una mayor exposición de aminoácidos hidrofóbicos o con grupos aromáticos que cuentan con la habilidad de donar protones y/o electrones se favorece la actividad antioxidante (Gómez et al., 2019). Por otro lado, la disminución del tamaño puede llevar a disminución de impedimentos estéricos asociados al gran tamaño de las proteínas (Williams et al., 2009) y la exposición de las cadenas laterales hidrofóbicas (Olagunju et al., 2018). Pero, por encima de cierto GH (alrededor del 24%), si la reacción no se detiene, la enzima puede seguir rompiendo enlaces peptídicos, llegando a degradar los péptidos ya formados y que poseen alguna actividad (Gómez y Zapata, 2014), por lo cual, la actividad de los hidrolizados va disminuyendo, porque no solamente el tamaño molecular de los péptidos sino también su composición y estructura molecular juegan una papel fundamental en la actividad antioxidante de los hidrolizados (Alemán, Giménez y Montero, 2011; Elmalimadi et al., 2017).

TEAC y FRAP son métodos químicos comúnmente utilizado para medir la capacidad reductora de hidrolizados (Tkaczewska et al., 2020). TEAC del HHY fue superior al reportado por el hidrolizado de residuos de palma de aceite y semilla de palma datilera con una actividad de 326,67 $\mu\text{mol ET Trolox/g}$ (Ng et al., 2013) y 460 $\mu\text{mol ET Trolox/g}$ (Ambigaipalan et al., 2015), respectivamente. La actividad antioxidante medida por FRAP para HPHY fue aproximadamente el doble que los obtenidos para hidrolizados de vísceras de tilapia (Gómez et al., 2019) y levadura de cerveza (Marson et al., 2019) con 627,2 y 641,0 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente.

Los hidrolizados de proteína de la harina de canola con Alcalasa, tenían un valor ORAC de 2200 $\mu\text{M ET/g}$ (Alashi et al. 2014), en el mismo orden de magnitud que el encontrado para el hidrolizado de hoja de yuca. El hidrolizado de semilla de palma datilera presento una actividad ORAC de 700 $\mu\text{mol ET Trolox/g}$ (Ambigaipalan et al., 2015), similar a la presentada por hidrolizados de harina desengrasada de soya entre 607,7 a 740,6 mM TE/g (Vernaza et al., 2012), las cuales son aproximadamente 2,8 veces inferior a la HHY.

La actividad quelante de hierro obtenida es mayor que la lograda a esta misma concentración por los hidrolizados de batata dulce preparado con Alcalasa, los cuales mostraron capacidad quelante de Fe^{2+} de 13,05% (Zhang, Mu y Sun, 2014). Los hidrolizados de proteína de garbanzo preparados con Alcalasa presentaron una actividad quelante de metales de 21,15% a 50,45 % a concentraciones de 1mg/ml a 5 mg/ml, respectivamente (Torres-Fuentes et al., 2015).

Según los resultados de esta sección, 2 h fue el tiempo seleccionado para realizar la hidrólisis porque la concentración de proteína después de este tiempo solo aumentó 4 unidades y el aumento en le GH solo fue de 2 unidades, lo que indica que prolongar 2 horas más la hidrólisis no sería viable. Además, a este tiempo el contenido de fenoles totales no aumenta significativamente y presenta mayor actividad antioxidante. Luego, de definir el tiempo las condiciones optimizadas de la hidrólisis de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®] fueron definidas como pH: 10, temperatura (T): 60,2 °C, enzima/sustrato (E/S): 0,015 y tiempo (t): 2h (HHY).

4.7 Estrés oxidativo en línea celular VSMC A7r5 del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

A continuación, se profundiza en la actividad antioxidante mediante el análisis de la inhibición del estrés oxidativo de la línea celular A7r5 al ser sometida a tratamiento con angiotensina II y con PHY e HHY. Antes de realizar el análisis de estrés oxidativo, la viabilidad de la célula fue estudiada. Para esto, las células fueron tratadas con PHY y HHY a una concentración de 0,1 mg/ml dando como resultado una viabilidad celular de 97,3% y 90,5 %, respectivamente, respecto a células sin tratar.

La generación de superóxido provocado por la Ang II en VSMC A7r5 fue medida mediante tinción con DHE. La reacción entre las especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS) y DHE produce etidio, un compuesto que se une al ADN nuclear y libera fluorescencia nuclear. La tinción

de DHE se ha utilizado como un ensayo basado en células en una serie de estudios que evalúan el potencial antioxidante de los péptidos bioactivos (Lin et al., 2017).

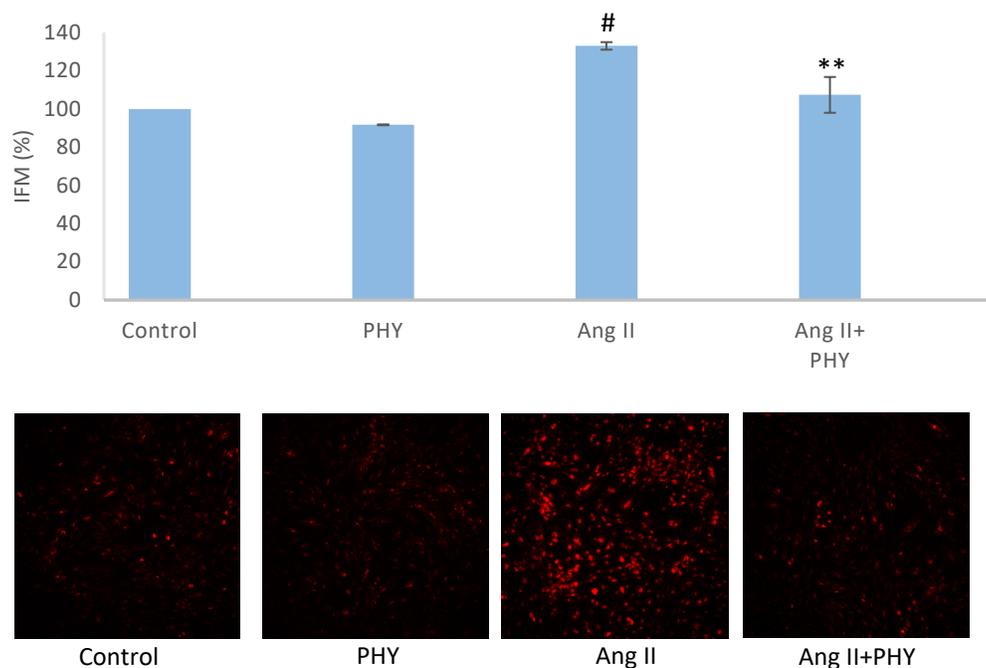


Figura 7 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por PHY (n = 3). Las células fueron pretratadas con 0,1 mg de PHY/mL de medio por 1 h antes de 0.5 h de estimulación con 1 μ M Ang II. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control; **, $p < 0,01$, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

El efecto del hidrolizado obtenido bajo las condiciones optimizadas (PHY y HHY) sobre la inhibición del estrés oxidativo en la línea celular A7r5 al ser sometida a tratamiento con angiotensina II y PHY - HHY se muestran en la Figura 7 y 8, donde se observa que hay una inhibición del estrés oxidativo de aproximadamente el 19 % y 40% respectivamente, respecto a las células tratadas con Ang II.

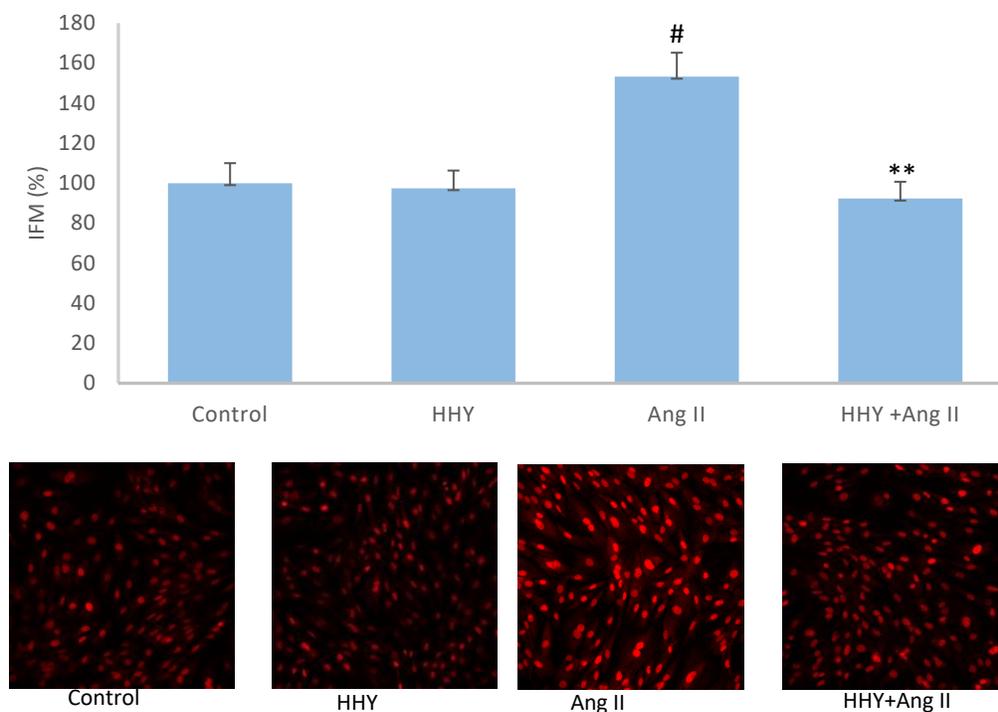


Figura 8 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por HHY (n = 3). Las células fueron pretratadas con 0,1 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control; **, $p < 0,01$, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

Antioxidantes naturales como vitamina C, tocoferoles, extractos de hierbas, así como los extractos de té, se han comercializado como alternativas a los antioxidantes sintéticos. También, se ha demostrado que las proteínas y los hidrolizados de proteína exhiben actividad antioxidante (Samaranayaka y Li-Chan, 2011b), pero pocos estudios hay relacionados con la actividad antioxidante de extracto proteico e hidrolizados preparados con hoja de yuca. En el presente estudio se ha encontrado el potencial antioxidante del extracto proteico y el hidrolizado de hoja de yuca. En los resultados hasta el momento, se observó que PHY presenta menor actividad antioxidante medida por el método de TEAC y FRAP y menor cantidad de fenoles totales que HHY. Resultados contrarios a los encontrados para ORAC, donde PHY presento actividad antioxidante mayor que HHY. Adicionalmente, la HHY presenta una inhibición mayor del estrés oxidativo ocasionado por Ang II en la línea celular A7r5

4.8 Actividades tecno-funcionales del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

El extracto proteico alcalino obtenido bajo las condiciones optimizadas (PHY) e hidrolizado de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®] a condiciones optimizadas (HHY) fue sometido análisis de la actividad espumante, estabilidad de la espuma, actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión a diferentes condiciones de pH.

4.8.1 Actividad espumante y estabilidad de la espuma del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®].

En la Figura 9 se observa la actividad espumante para PHY donde se muestra que tiene un valor máximo a pH 11 del 34% y la estabilidad de la espuma máxima a pH 3 del 28%.

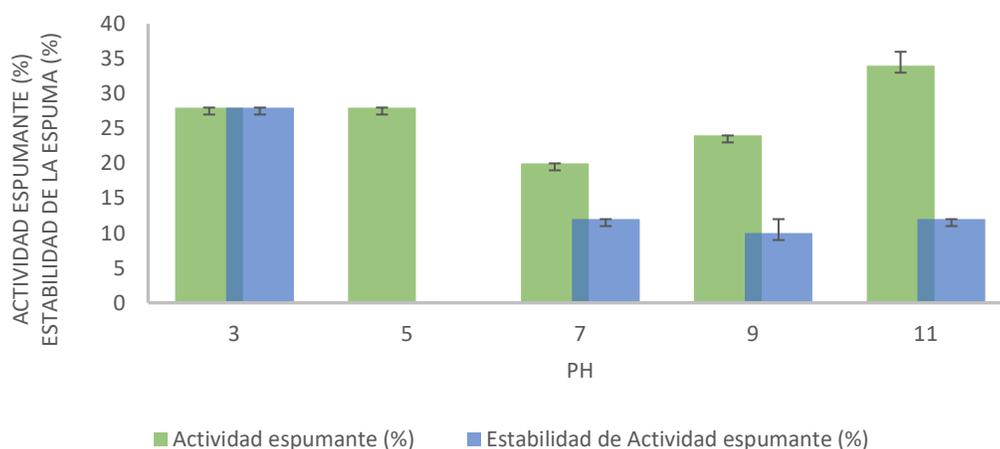


Figura 9 Actividad espumante y estabilidad de la espuma del extracto proteico alcalino obtenido a condiciones optimizadas en función del pH.

En la Figura 10 se muestra el comportamiento de la actividad espumante y la estabilidad de la espuma del HHY, donde se observa que a pH 3 y GH 10,1 se obtiene la actividad de la espuma más alta que es aproximadamente 30% con una estabilidad de la espuma de 30%.

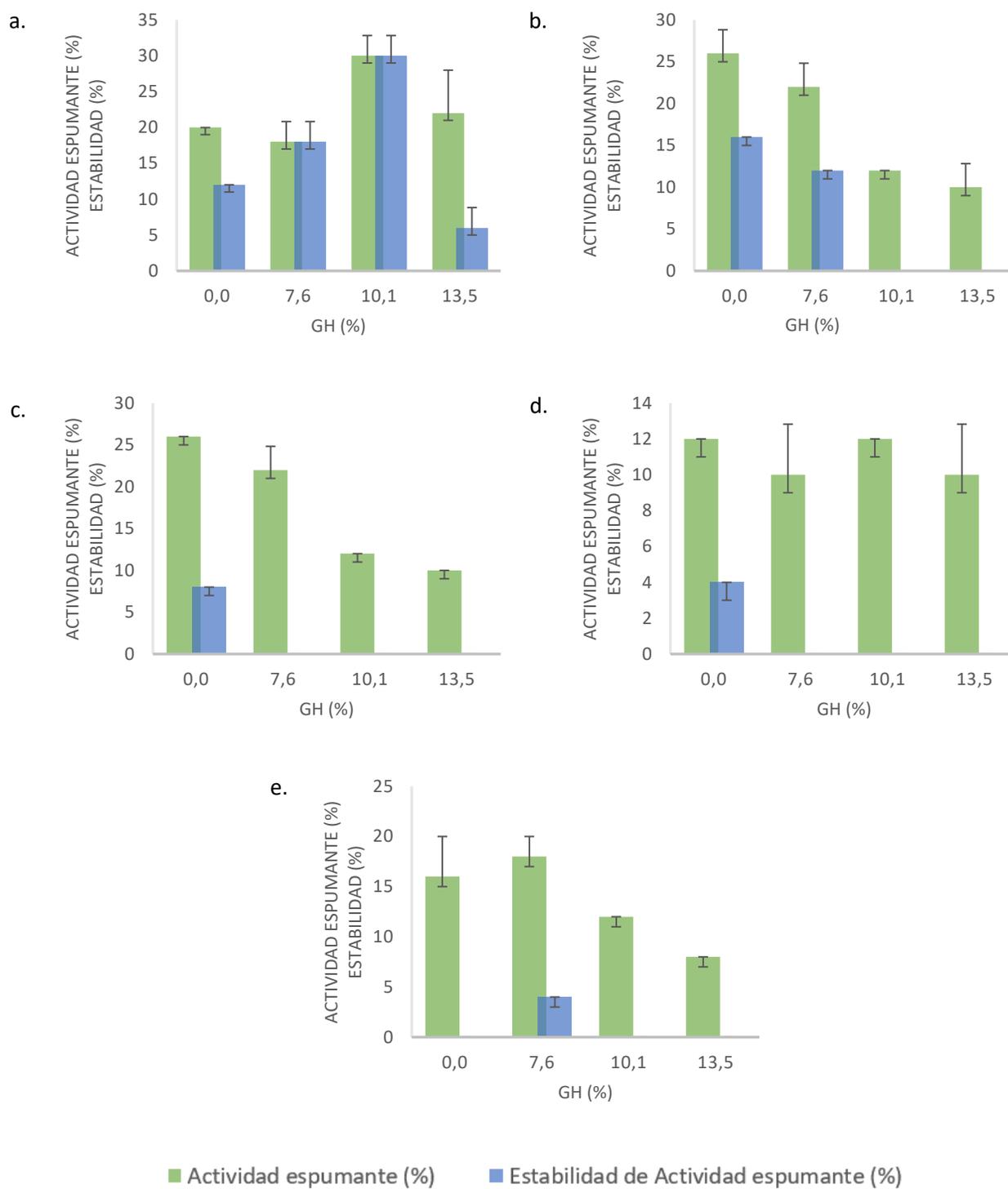


Figura 10. Actividad espumante y estabilidad de la espuma del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L® obtenido bajo condiciones optimizadas en función de GH y pH a una concentración de 5 g/L. a. pH: 3; b. pH: 5, c. pH: 7, d. pH: 10 y e. pH: 11. GH: grado de hidrólisis.

El hidrolizado de membrana de huevo de gallina presentó actividad espumante de 28,3 % y una estabilidad de la espuma de 15% (Jain y Anal, 2016), similar a la obtenida por HHY que se movió entre 18 y 30 % de actividad y estabilidad espumantes entre 6 y 30%. Mientras para PHY la actividad se movió entre 20-34% con una estabilidad entre 0-28%. La deficiente formación de espuma puede deberse a la naturaleza de hoja de yuca puede ser esférica, lo que reduce la capacidad de formar membranas superficiales alrededor de las burbujas de aire (Daliri et al., 2021). Para tener una capacidad espumante más alta, las proteínas o péptidos deben dispersarse fácilmente en agua, migrar rápidamente a la capa límite entre agua (suspensión) - el aire y expandir su estructura para crear una capa alrededor del aire (Wouters et al., 2019). La flexibilidad física de las proteínas, el contenido de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos y su capacidad para reducir la tensión superficial son algunos de los factores que inciden en la propiedad espumante (Bessada et al., 2019). Los resultados podrían deberse a que las proteínas presentes en PHY y HHY fueron de tamaño pequeño, que generalmente no son buenas para generar espuma (Wouters et al., 2019). Este resultado podría deberse a una hidrólisis demasiado extensa puede hacer que los péptidos pierdan su anfifilicidad o inducir la agregación de péptidos, lo que puede resultar en péptidos menos tensioactivos que solo pueden formar películas interfaciales débiles, por lo tanto, espumas menos estables (Yang y Sagis, 2021).

Por otro lado, un inconveniente de las condiciones alcalinas extremas es la oxidación de los fenoles, lo que conduce a moléculas de quinona altamente reactivas. Estas quinonas pueden interactuar covalentemente con proteínas, formando agregados de proteínas. La interacción covalente proteína-fenol también puede inducir la alteración de la estructura de la proteína, a menudo, disminuir la hidrofobicidad de la superficie de la proteína afectando tanto las propiedades biológicas como las funcionales. Parece que tanto el tipo de fenol (tamaño, flexibilidad y grupos laterales) como la proteína (compacidad de la estructura de la proteína e hidrofobicidad superficial) juegan un papel en el efecto sobre las propiedades funcionales (Yang y Sagis, 2021), siendo uno de los factores que pudo influir para que la actividad espumante presentada por PHY y HHY fuera menor a la esperada.

4.8.2 Actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del extracto proteico alcalino e hidrolizado de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L®

La actividad emulsificante de PHY tiene un valor máximo a pH 11 de 80,2 m²/g y una estabilidad de la espuma de 54,4 min a pH 9 (Figura 11). Sin embargo, a este mismo pH la actividad emulsificante fue de 67,9 m²/g indicando que a pH 9 tiene un mejor comportamiento la emulsión.

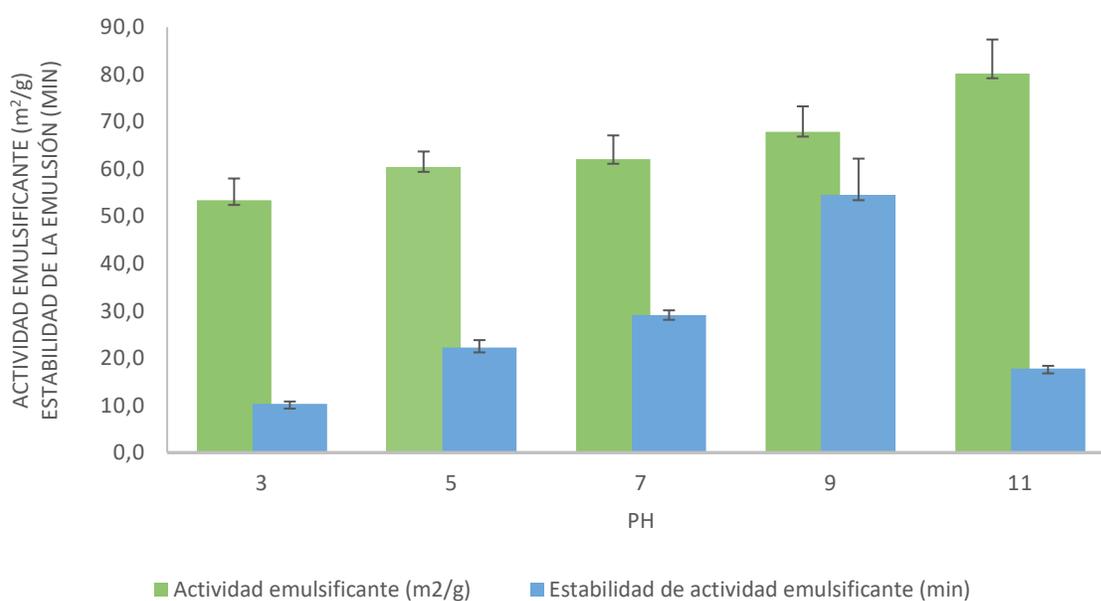


Figura 11 Actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del extracto proteico alcalino obtenido a condiciones optimizadas en función del pH.

En la Figura 12 se observa el índice de actividad emulsionante (IAE) y estabilidad de la emulsión con valores entre 57,8 – 102,6 m²/g y 10,8 -16,8 min. Los resultados indican que a un GH de 7,6%, pH 5, 10 y 11 se favorece IAE, mientras que a GH 10,1 y 13,5 IAE disminuye.

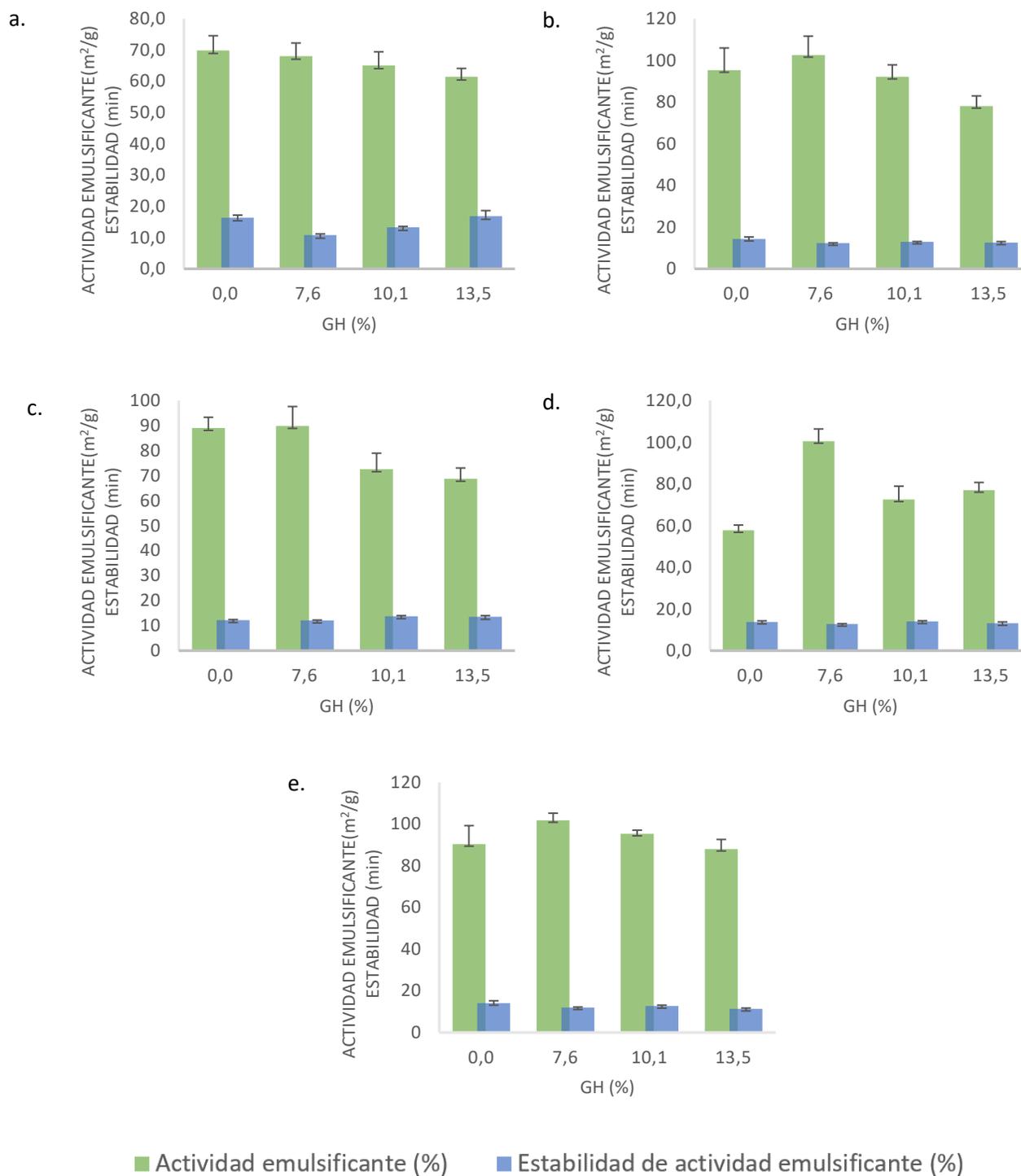


Figura 12 Actividad emulsificante y estabilidad de la actividad emulsificante del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L[®] obtenido bajo condiciones optimizadas en función de GH y pH. a. pH: 3; b. pH: 5, c. pH: 7, d. pH: 10 y e. pH: 11.

Las proteínas y los hidrolizados de proteínas son agentes tensoactivos que pueden adsorberse en el área interfacial y reducir la tensión interfacial para la formación de una capa interfacial estabilizada y la creación de gotitas uniformemente dispersas (León et al., 2015). La actividad emulsificante del PHY oscilo entre 53,4 – 80,2 m²/g, aumentando a medida que aumentaba el pH. Mientras, para el HHY fue mayor entre 57 y 102 m²/g, lo que indica una mayor capacidad de formar películas estables alrededor de las gotas de aceite por parte de los péptidos con un peso molecular más bajo en comparación con las moléculas de proteína grandes. Datos similares han sido encontrados para proteína e hidrolizado de quinua (Daliri et al., 2021). El hidrolizado de membrana de huevo de gallina presentó índice de actividad emulsificante de 48,9 m²/g (Jain y Anal, 2016), inferior al de HHY, pero con una estabilidad de 17,9 min superior a HHY que se movió entre 12 y 16,8 min

Sin embargo, la actividad emulsionante de los péptidos se reducirá y debilitará en caso de demasiada hidrólisis de proteínas (Daliri et al., 2021) como se observa con HHY con GH por encima de 7,6% donde la actividad emulsificante empezó a disminuir, debido a que los péptidos de bajo peso molecular no son lo suficientemente capaces de mostrar características superficiales y anfifílicas entre gotitas contiguas en emulsión, probablemente debido a sus cadenas cortas (Zhang et al., 2021).

PHY mostró una estabilidad entre 10 – 54 min, superior a HHY que se movió entre 12 – 16,8 min, este comportamiento se debe a que tiene moléculas más largas y grandes para formar una red más estable entre las gotas de aceite (Fathollahy et al., 2021). Tanto para HHY como para PHY, los valores de pH más altos fueron más efectivos para obtener un EAI y un ESI más altos. Esto puede explicarse por una repulsión más intensa entre las proteínas y los péptidos (Daliri et al., 2021). Los resultados mostraron que la hidrólisis de Alcalasa 2,4L[®] aumentó la actividad superficial en el hidrolizado de proteína de hoja de yuca, lo que indica que este hidrolizado podría ser un candidato potente para aplicaciones como emulsificante.

4.9 Caracterización del extracto proteico de hojas de yuca e hidrolizado enzimático de hojas de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

El extracto proteico de hoja de yuca presentó concentración de proteína de 43,19% (Tabla 21), similar a lo encontrado para extracto proteico de semilla de chia con 49,7% (Coelho y Salas-Mellado, 2018), extracto proteico de hojas de coliflor de 57% (Xu et al., 2017), extracto proteico de té con 56,4% (Shen et al. 2008).y extracto proteico de harina de canola 58,12% (Gerzhova et al., 2016).

Tabla 21 Caracterización fisicoquímica de extracto proteico de hojas de yuca (PHY) e hidrolizado enzimático de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®] (HHY) a condiciones optimizadas.

	PHY	HHY
Humedad (%)	12,23 ±0,38	16,09±0,66
Cenizas (%) *	13,43±0,06	14,65±0,08
Extracto etéreo (%) *	9,02±0,24	6,90±0,24
Proteína (%) *	43,19 ± 1,2	45,99 ± 1,33
Carbohidratos (%) *	34,36	32,46

*resultado en base seca

El contenido de proteína de HHY fue superior a los obtenidos para los hidrolizados de salvado de arroz (30,3 y 31,6%) (Thamnarathip et al., 2016) e hidrolizados de residuos de cebada de cerveza (41,5%) (Marson et al., 2019). Mientras el contenido de proteína para hidrolizados de harina desengrasada de soya preparados con Alcalasa mostraron un contenido de proteína entre 52,9 y 66,8 % (Vernaza et al., 2012).

El contenido de aminoácidos de HHY y PHY se observa en la Tabla 22. Los aminoácidos en mayor proporción en HHY fueron Tyr, Ile, Asp, Glu, Cít, Lys y Ala. Mientras que para PHY

fueron Lys, Tyr, Glu y Asp. La función de cualquier péptido depende principalmente de su composición de aminoácidos, se ha demostrado que la presencia de Tyr, Met, His y Lys contribuye en gran medida a la potencia de los péptidos antioxidantes. His en particular se le atribuye una fuerte actividad de eliminación de radicales debido a la descomposición de su anillo de imidazole. Además, los aminoácidos ácidos como Glu y Asp tienen fuertes efectos antioxidantes debido a la presencia de electrones en exceso que pueden ser donados durante la interacción con los radicales libres (He et al., 2013). Sin embargo, la posición de los aminoácidos en la secuencia peptídica influye en el efecto antioxidante. Por lo tanto, se debe controlar las condiciones del proceso de hidrólisis para obtener cadenas peptídicas con la composición y el posicionamiento correctos de los aminoácidos.

Tabla 22 Contenido de aminoácidos de extracto proteico de hojas de yuca (PHY) e hidrolizado enzimático de harina de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®] (HHY) a condiciones optimizadas.

Aminoácidos	PHY (g aa/100 g proteína)	HHY (g aa/100 g proteína)
Histidina	3,2	3,2
Treonina	2,8	2,1
Tirosina	17,2	11,1
Fenilalanina		3,8
Valina	3,6	3,5
Arginina	1,9	1,5
Metionina	3,4	1,8
Isoleucina	2,8	10,6
Leucina	5,7	5,2
Lisina	21,8	6,8
Ácido Aspártico	6,4	8,4
Serina	5,1	3,2

Ácido		
Glutámico	8,1	7,1
Asparagina	1,8	2,4
Glicina	1,7	0,8
Alanina	5,4	6,4
Cisteína	2,8	2,4
Citrulina	5,5	7,0
<hr/>		
AAT	99,4	87,3
AAE	62,5	49,7
AAH	22,6	32,2
AAA	60,1	42,3

AAT: aminoácidos totales; AAE: aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Val, His y Arg); AAH: aminoácidos hidrofóbicos (Gly, Ala, Val, Met, Phe, Ile y Leu); AAA aminoácidos antioxidantes (Asp, Glu, Met, Tyr, Phe, His y Lys.)

4.10 Purificación y secuenciación de péptidos

En las anteriores secciones, se observó que la propiedad predominante es la actividad antioxidante, por lo cual PHY y HHY fueron purificados para aumentar la actividad antioxidante, es decir, que el siguiente paso de purificación se llevó a cabo sobre la fracción más activa obtenida en cada tratamiento. La purificación se realizó usando membranas de celulosa para purificar por peso molecular, seguido de separación por hidrofobicidad usando columna de cartucho C18, por último, se sometió a purificación por RP-HPLC. Las secuencias de péptidos se analizaron a través de un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) y la ionización se realizó mediante la técnica de ionización por electropulverización (ESI), mientras los datos se analizaron con el software MassLynx versión 4.1 mediante secuenciación de novo.

4.10.1 Purificación por membranas de celulosa de extracto proteico alcalino de hoja de yuca

En la Tabla 23 se observa los resultados del fraccionamiento por peso molecular del PHY donde se observa que la proteína no se concentró con este tratamiento, los fenoles totales no presentan diferencias significativas con PHY. TEAC y FRAP mostraron un aumento en F1, F2 y F3. La actividad quelante de hierro aumento en F3 y ORAC mostro una disminución en la actividad.

Tabla 23 Propiedades de las fracciones por peso molecular del extracto proteico de hoja de yuca obtenido a condiciones optimizadas.

Fracción	Proteína (%)	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	Quelante de hierro (0,5 mg/ml %)
PHY	37,91 \pm 1,2	126,88 \pm 3,30 ^a	1620,63 \pm 28,70 ^a	609,72 \pm 18,93 ^a	2715,63 \pm 329,84 ^a	45,37 \pm 4,43 ^a
F1	30,27 \pm 1,1	133,22 \pm 15,22 ^a	3153,33 \pm 15,27 ^b	1017,92 \pm 15,02 ^b	2212,61 \pm 5,02 ^b	47,32 \pm 3,30 ^{a,b}
F2	28,90 \pm 3,0	114,20 \pm 5,85 ^a	3206,67 \pm 41,63 ^b	1304,03 \pm 4,81 ^c	1943,01 \pm 45,15 ^b	38,91 \pm 0,65 ^a
F3	23,13 \pm 4,3	127,10 \pm 10,26 ^a	2411,38 \pm 26,87 ^c	1199,12 \pm 50,46 ^d	618,08 \pm 65,16 ^c	54,13 \pm 5,17 ^b
F4	21,75 \pm ND	73,33 \pm 1,54 ^b	1303,33 \pm 87,37 ^d	506,81 \pm 71,24 ^e	1045,34 \pm 56,42 ^d	22,50 \pm 3,78 ^c

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Proteína, proteína en base seca; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígenos; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo. F1, >100 KDa; F2, 10–100 KDa; F3, 3–10 KDa; F4, <3 KDa.

La actividad quelante de hierro fue mayor en PHY donde se obtuvo resultados entre 22,50 y 54,13 % con máximo en la fracción de peso molecular entre 3- 10 kDa, mayor que la encontrada para la proteína de semilla de pimentón marrón donde obtuvieron una actividad de 4,83% a una concentración de 3mg/ml (Mo et al., 2018).

En la Figura 13, se muestra la viabilidad de la línea celular A7r5 tratada con las fracciones por peso molecular, donde se evidencia que F2, F3 y F4 tienen viabilidad por encima del 90%, mientras F1 tiene una viabilidad del 73% a una concentración de 2 mg/ml.

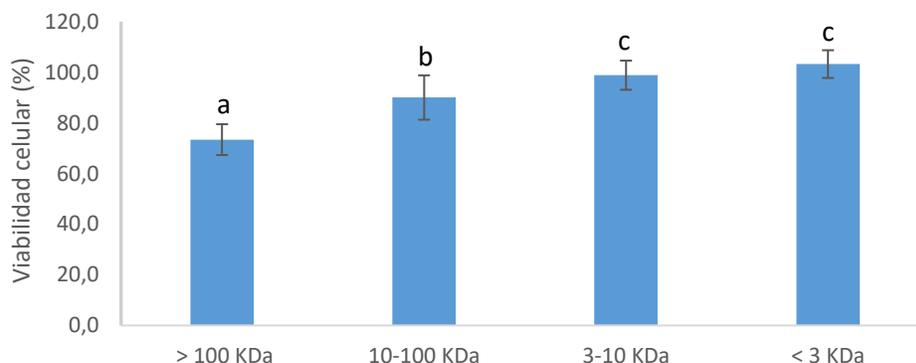


Figura 13 Viabilidad de la línea celular A7r5 tratada con las fracciones con diferente peso molecular de PHY (n =6). Diferentes letras indican diferencia significativa en $p < 0,05$.

En la Figura 14, se observa que las fracciones por peso molecular de PHY no presentan una inhibición sobre el estrés oxidativo de las células del músculo liso vascular causado por el tratamiento con Ang II, sin embargo, no tienen un efecto negativo sobre el estrés en las células.

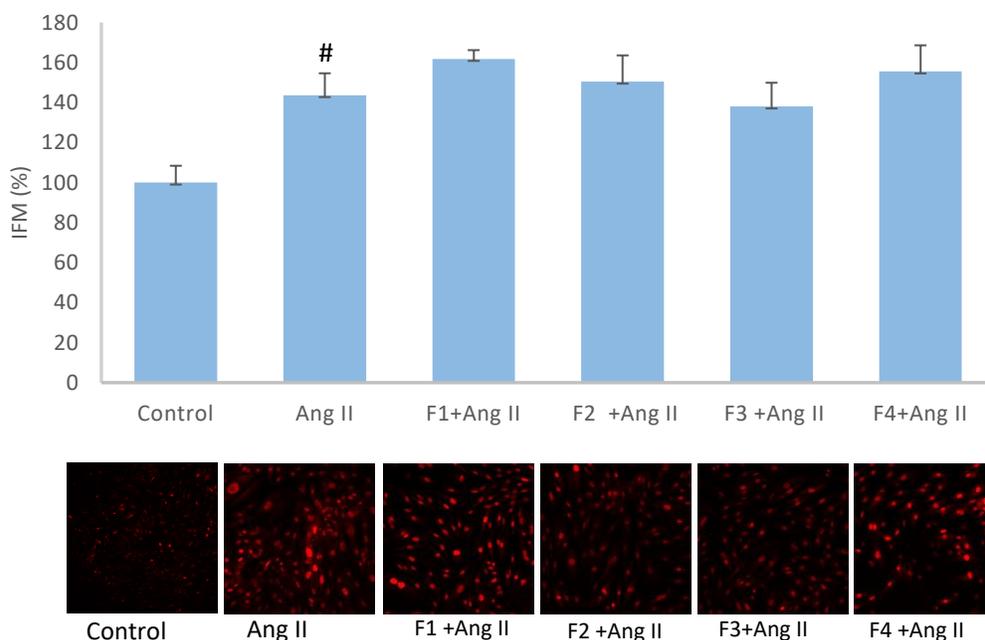


Figura 14 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por fracciones de PHY con diferente peso molecular (n = 3). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

Debido a que no hubo un aumento en la concentración de proteína, que la actividad de ORAC no tuvo aumento y que las fracciones por peso molecular no inhibieron el estrés oxidativo causado por Ang II se decidió dejar el tratamiento del extracto proteico de hoja de yuca hasta el fraccionamiento por peso molecular, ya que es más viable usarlos completos.

4.10.2 Purificación de péptidos antioxidantes por membranas de celulosa de hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

El HHY con DH 24,35% fue fraccionado por peso molecular mediante membranas de ultrafiltración en cuatro fracciones (> 100 KDa, 10 – 100 KDa, 3 – 10 KDa y < 3 KDa), a cada fracción se le determinó su contenido de proteína, fenoles totales y actividad antioxidante como datos complementarios. En la Tabla 24, se muestra las fracciones con diferente peso molecular de HHY donde se observa que la proteína de HHY, F3 y F4 no presentan diferencias significativas, los fenoles se concentraron en F1-F4. La actividad antioxidante medida por TEAC aumento en la F3. FRAP no presento diferencias significativas entre HHY y F2, mientras, F3 aumento, este mismo comportamiento tuvo ORAC. Por su lado, quelante de hierro aumento para F2 y F3.

Tabla 24 Propiedades de las fracciones con diferente peso molecular del hidrolizado de hoja de yuca usando Alcalasa 2,4L[®] obtenido bajo condiciones optimizadas.

Fracciones	Proteína (%)	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	TEAC (μmol TE/g)	FRAP (μmol TE/g)	ORAC (μmol TE/g)	Quelante de hierro (0,5 mg/ml, %)
HHY	38,59±1,33 ^c	32,76±15,48 ^a	2880,33±105,3 ^a	1206,81±38,71 ^a	2135,56±44,13 ^a	30,71±0,65 ^{a,c}
F1	26,19±2,19 ^a	83,41±6,03 ^b	1705,00±35,35 ^b	426,25±30,05 ^b	1476,18±177,56 ^b	27,50±1,48 ^a
F2	31,53±2,61 ^b	140,80±7,99 ^c	2520,00±31,75 ^c	1278,96±68,56 ^a	2184,06±66,19 ^a	38,47±1,69 ^b
F3	38,83±3,87 ^c	113,12±10,56 ^d	3075,00±21,21 ^d	1494,17±52,04 ^c	2849,67±58,84 ^c	33,34±4,18 ^c
F4	39,25±4,08 ^c	97,03±10,60 ^d	1553,33±15,27 ^e	385,97±20,55 ^b	441,79±12,99 ^d	16,91±1,27 ^d

Los valores fueron presentados como media ± DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Proteína, proteína en base seca; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe 3+; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígenos; μmol ET/g, μmol Equivalente Trolox por gramo. F1, >100 KDa; F2, 10–100 KDa; F3, 3–10 KDa; F4, <3 KDa.

Se observa, que la actividad antioxidante para HHY más alta la presenta la fracción con peso molecular entre 3 -10 KDa (F3). Comportamiento similar fue obtenidos en fracciones de hidrolizados de cebada (Xia et al., 2012), gluten de trigo (Cian, Vioque y Drago, 2015; Elmalimadi et al., 2017) y soya (Domí y Parajo, 2006). Por lo general, la actividad es mayor en fracciones con peso molecular menor a 10 kDa (Alashi et al., 2014; Kimatu et al., 2017), en este rango algunos estudios han encontrado que no hay correlación entre la actividad antioxidante y el peso molecular de los péptidos (Olagunju et al., 2018), lo que indica que es necesario evaluar varios rangos por debajo de 10 kDa. Lo anterior, puede explicar que F4 (< 3kDa) a pesar de presentar el mayor contenido de proteína y menor peso molecular es la fracción que menor actividad antioxidante presenta.

En la Figura 15 se observa que la viabilidad de las células A7r5 al ser tratadas con las fracciones de HHY, F1 y F4 presentaron viabilidad por debajo del 70%, mientras, F2 y F3 no presentan diferencias significativas con viabilidad de aproximadamente 100%.

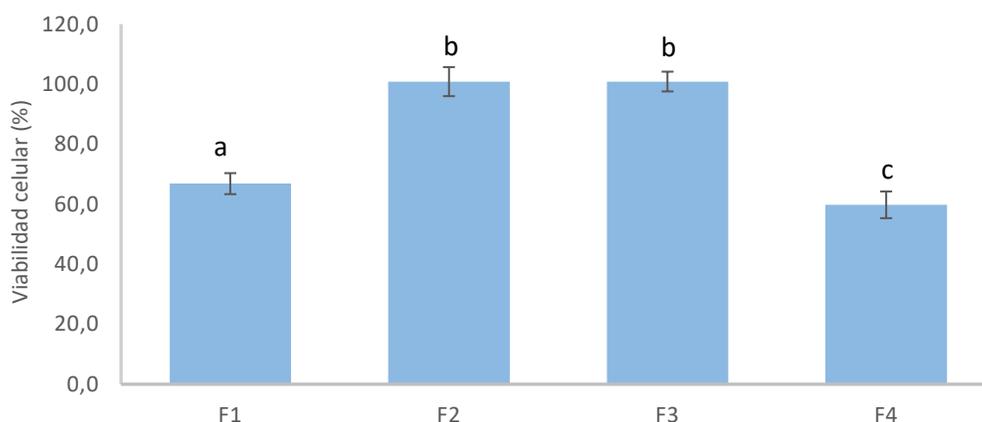


Figura 15 Viabilidad de la línea celular A7r5 tratada con las fracciones con diferente peso molecular de HHY (n =6). Diferentes letras indican diferencia significativa en $p < 0,05$.

En la figura 16, se observa que F2 y F3 logran inhibir el estrés oxidativo incluso por debajo del control (células sin Ang II) en aproximadamente 47%, mientras, las F1 y F4 no logra inhibir

la producción de las especies reactivas de oxígeno en VSMC A7r5, lo que corresponde con lo observado en la actividad antioxidante medida por los métodos químicos, señalando la validez de estos métodos como estrategia preliminar en la evaluación de compuestos antioxidantes, teniendo en cuenta el costo en tiempo y recursos de los estudios con células.

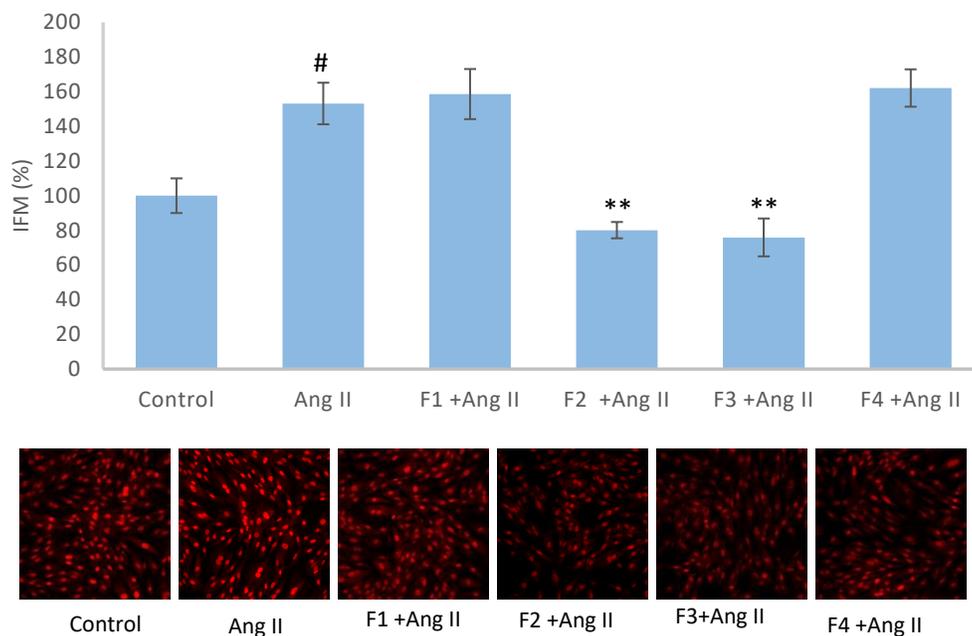


Figura 16 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por fracciones de HHY con diferente peso molecular ($n = 3$). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control. **, $p < 0,01$, en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

Según los resultados obtenidos se procede a purificar F3 por hidrofobicidad, ya que fue la fracción donde la concentración de proteína no disminuyó, presentó mayor actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC, FRAP, ORAC, además, inhibió el estrés oxidativo en las células A7r5. En tal sentido F3 fue sometida a un proceso de purificación en una columna C18 Cartridges (Waters Corporation, EE. UU.). Se recuperaron 5 fracciones 0% ACN (F3-1), 5% ACN (F3-2), 15% ACN (F3-3), 30% ACN (F3-4) y 60% ACN (F3-5).

4.10.3 Purificación de la fracción de hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] mediante métodos cromatográficos

4.10.3.1 Separación por hidrofobicidad usando columna de cartucho C18

En la Tabla 25 se observa que la proteína se concentra en las fracciones F3-2, F3-3 y F3-4; el contenido de fenoles no presento diferencias significativas entre estas mismas fracciones ($p < 0,5$), pero, disminuye con respecto a HHY. La actividad antioxidante medida por TEAC aumento para F3-3. FRAP y ORAC aumentaron para las fracciones F3-1, F3-2 y F3-3.

Tabla 25 Propiedades de las fracciones de F3 separadas por hidrofobicidad del hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®]

Fracciones	Proteína (%)	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
F3-1	26,56 \pm 0,30 ^a	108,86 \pm 18,59 ^a	2865,33 \pm 64,66 ^a	1819,17 \pm 46,40 ^a	2851,03 \pm 340,82 ^a
F3-2	46,48 \pm 2,22 ^b	95,10 \pm 0,81 ^{a,b}	2977,33 \pm 79,61 ^a	1641,39 \pm 48,83 ^b	3036,91 \pm 18,92 ^{a,b}
F3-3	51,66 \pm 1,64 ^c	93,78 \pm 1,24 ^{a,b}	3159,33 \pm 49,17 ^b	1519,17 \pm 91,66 ^c	3481,04 \pm 177,57 ^b
F3-4	50,87 \pm 1,42 ^c	92,91 \pm 3,13 ^{a,b}	2196,67 \pm 89,63 ^c	591,53 \pm 19,70 ^d	445,43 \pm 17,16 ^c
F3-5	43,00 \pm 1,00 ^b	79,64 \pm 0,44 ^b	2443,33 \pm 64,29 ^d	676,25 \pm 25,35 ^d	396,21 \pm 34,25 ^d

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ACN: concentración de acetonitrilo; Proteína, proteína en base seca; TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe³⁺; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígenos; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo. F3-1, 0% ACN; F3-2, 0-5% ACN; F3-3, 5-15% ACN; F3-4, 15-30% ACN; F3-5, 30-60% ACN.

La figura 17, muestra que la fluorescencia generada fue mayor cuando la célula fue estimulada con Ang II, lo que indica la generación de estrés en la célula, por lo tanto, el aumento en la producción de ROS. Este efecto fue contrarrestado por F3-1, F3-2 y F3-3 indicando una acción inhibitoria contra el efecto de la Ang II.

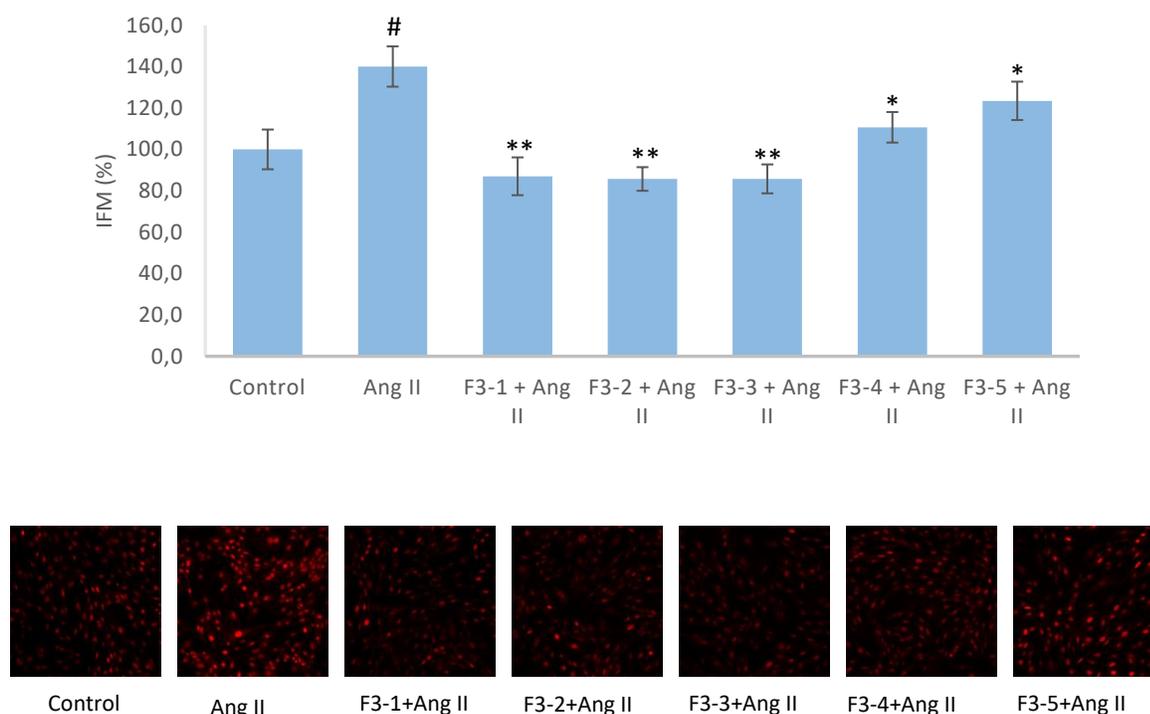


Figura 17 Inhibición del estrés oxidativo en línea celular de músculo liso vascular (A7r5) tratada con Ang II por las fracciones derivadas de F3 del hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L[®] (n = 3). Las células fueron pretratadas con 2 mg/mL durante 1 h antes de la estimulación de 0,5 h con Ang II 1 μ M. El estrés oxidativo se normalizó al del grupo tratado con Ang II. #, $p < 0,05$, comparado con el control. **, $p < 0,01$, *, $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con Ang II. Se muestran imágenes representativas debajo del gráfico de barras.

La actividad antioxidante ORAC es el ensayo *in vitro* más utilizado debido a su alta relevancia biológica (Ranamukhaarachchi, Meissner y Moresoli, 2013), que se corresponde bien con los resultados observados en el análisis de células para las fracciones derivadas de HHY. Se encontraron resultados similares para FRAP, pero, no para el ensayo TEAC. Cabe mencionar que los fitoquímicos como los compuestos fenólicos, también, pueden contribuir a la actividad

antioxidante del HHY y sus fracciones derivadas, reflejando el alto contenido de fenoles en F3-1, F3-2 y F3-3 y su alta actividad antioxidante medida por los métodos de FRAP, ORAC y celular. Curiosamente, F3, que tenía un mayor contenido de fenoles, exhibió una actividad antioxidante en general más baja en comparación con sus subfracciones. También, encontramos que F3-4, que tenía un contenido comparativo de fenoles como los de F3-2 y F3-3, pero mostraba FRAP, ORAC y actividad antioxidante celular significativamente más baja. F3-1, con el mayor contenido de fenoles, pero el menor contenido de péptidos mostró las altas actividades en múltiples ensayos. Estas variaciones podrían deberse a una acción combinada de péptidos y fenoles, que dependía de la composición de péptidos y fenoles en cada fracción. Sin embargo, este supuesto requiere ser verificado en estudios futuros.

Los datos obtenidos para HHY y sus fracciones es similar a los resultados de péptidos o hidrolizados derivados de otras proteínas alimentarias como IRW (de clara de huevo) (Liao et al., 2016), LRW (de guisante)(Wang et al., 2020), VRP, LKY, VRY y VVHPKESF (del músculo) (Ranamukhaarachchi, Meissner y Moresoli, 2013). Las ROS producidas en las VSMC conducen a inflamación vascular y cambios estructurales, lo que da como resultado una remodelación vascular y un deterioro de la función vascular, lo que conduce al desarrollo de hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Wang et al., 2018). Por lo tanto, la capacidad de HHY y sus fracciones para inhibir el estrés oxidativo en las VSMC puede ser una indicación de su actividad antiinflamatoria, pero, esto requiere un estudio a mayor profundidad. La reducción de ROS en las VSMC después del tratamiento con HHY y sus fracciones sugirió su potencial para modular la función vascular y otros eventos cardiovasculares.

4.10.3.2 Purificación por RP-HPLC

Según los resultados de la sección anterior, se decide purificar por RP-HPLC las fracciones F3-1, F3-2 y F3-3 ya que se logró concentrar la proteína, la actividad antioxidante aumento

respecto a F3 e inhibieron el estrés oxidativo de las células *A7r5*. Los picos recolectados se muestran en la Figura 18.

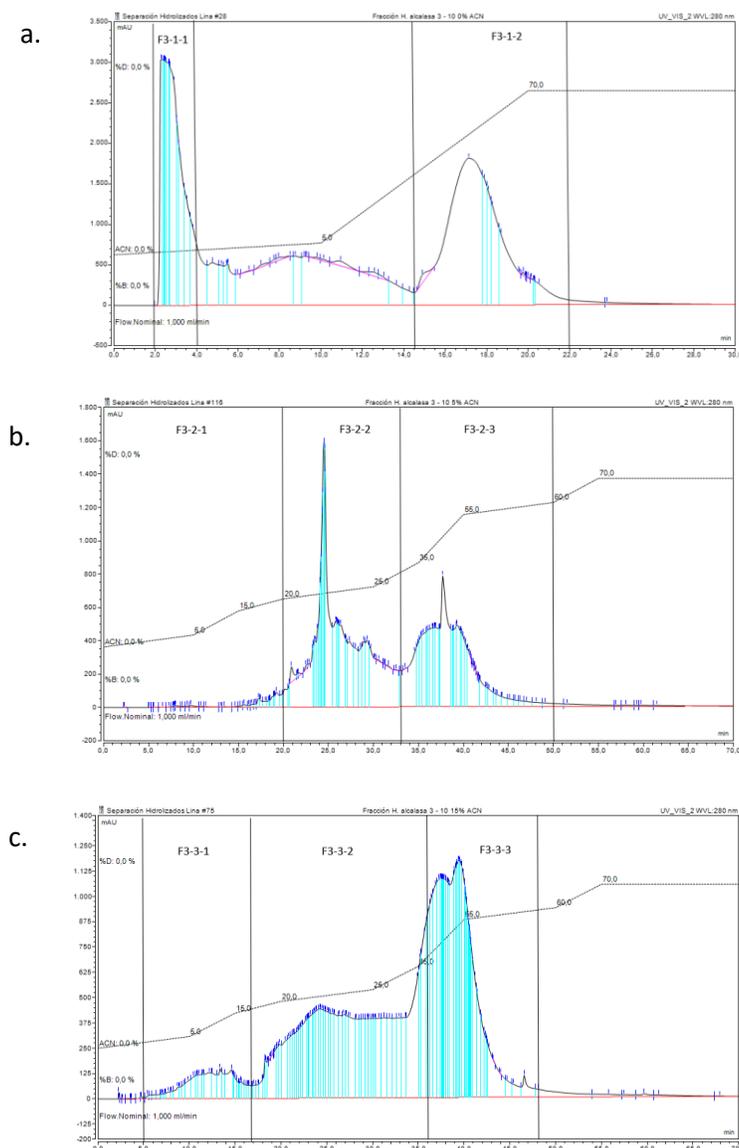


Figura 18 Perfiles de elución de la separación por fase reversa (RP-HPLC.) de las fracciones de hidrolizado de hoja de yuca obtenido con Alcalasa 2,4L[®] a condiciones optimizadas. a. F3-1; b. F3-2; c. F3-3. ACN: concentración de acetonitrilo.

En la Tabla 26, se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los picos recolectados en la separación RP-HPLC, donde se observó que la fracción F3-2-2 es la que potencia más la actividad respecto a las fracciones obtenidas en las otras etapas de purificación.

Tabla 26 Propiedades de las fracciones de F3-1, F3-2 y F3-3 separadas por RP-HPLC del hidrolizado enzimático de hoja de yuca con Alcalasa 2,4L®.

Fracciones	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
F3-1-1	511,30 \pm 1,85 ^a	980,53 \pm 61,39 ^{a,d}	1379,26 \pm 33,54 ^a
F3-1-2	84,85 \pm 0,18 ^b	127,61 \pm 5,00 ^b	220,38 \pm 4,36 ^b
F3-2-1	146,78 \pm 1,77 ^b	142,80 \pm 1,65 ^b	194,26 \pm 27,12 ^c
F3-2-2	8154,35 \pm 461,18 ^c	8047,62 \pm 134,83 ^c	19418,13 \pm 750,53 ^d
F3-2-3	183,10 \pm 3,08 ^b	164,94 \pm 12,42 ^b	177,10 \pm 20,42 ^c
F3-3-1	1404,91 \pm 117,87 ^d	1053,48 \pm 14,45 ^a	2144,70 \pm 75,07 ^e
F3-3-2	870,51 \pm 43,19 ^e	945,81 \pm 34,00 ^d	2151,44 \pm 69,64 ^e
F3-3-3	715,26 \pm 35,66 ^{a,e}	703,74 \pm 51,93 ^e	2939,53 \pm 135,38 ^f

Los valores fueron presentados como media \pm DE (n = 3). Los valores de las columnas con diferentes letras minúsculas en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). TEAC, capacidad antioxidante equivalente Trolox; FRAP, Actividad antioxidante reductora de Fe^{3+} ; ORAC, Capacidad de captación de radicales oxígenos; $\mu\text{mol ET/g}$, μmol Equivalente Trolox por gramo.

4.10.4 Secuenciación

El pico F3-2-2 fue seleccionado para secuenciar péptidos antioxidantes, los cuales fueron analizados a través de LC-MS/MS. Las secuencias de péptidos identificadas se enumeraron en la Tabla 27, y el espectro representativo respectivo de péptido de novo MS/MS del pico F3-2-2 (Figura 19).

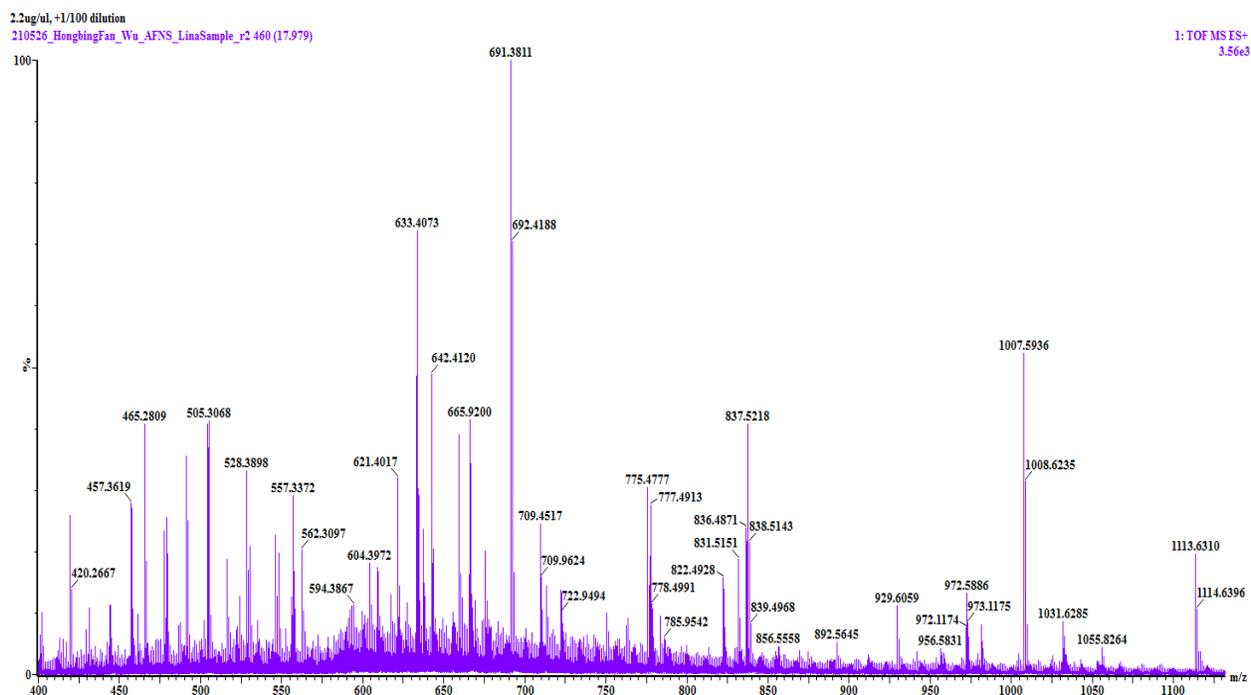


Figura 19 Espectro LC-MS/MS de F3-2-2 del hidrolizado enzimático de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L®.

En la fracción de HHY con mayor actividad antioxidante fueron identificados 11 péptidos, los cuales tienen presencia de aminoácidos como Pro y Ala contribuyen a la eliminación de radicales libres en péptidos antioxidantes (Silva et al., 2017). Los péptidos de bajo peso molecular exhiben actividad potencial antioxidante, principalmente si presentan aminoácidos hidrófobos como Leu o Val, aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr) o residuos de His (Zhang et al., 2010). Para ORAC se ha reportado que la exposición durante la hidrólisis de residuos no polares cifrados como Gly, Ala, Ile, Trp, Tyr y Met, puede aumentar las interacciones hidrofóbicas de los péptidos con agentes oxidantes como se evidencio en la Tabla 27 donde esta actividad aumento en el pico que fue secuenciado (Urbizo-Reyes et al., 2019).

Los aminoácidos como Lys tienen una capacidad de quelación de iones metálicos (Zhang et al., 2015), y la Met, Pro, Ala, Gly, Val y Leu tienen una mayor capacidad de eliminación de radicales (Zhang et al., 2019). Se ha informado que la Met, Glu, Gln, Lys y Arg contribuyeron a la mejor actividad antioxidante (Zhang et al., 2019). La mayor actividad antioxidante de los

péptidos en comparación con los aminoácidos libres se atribuye a las propiedades químicas y físicas únicas conferidas por su secuencia de aminoácidos, especialmente la estabilidad de los radicales peptídicos resultantes que no inician ni propagan más reacciones oxidativas (Samaranayaka y Li-Chan, 2011b).

Tabla 27 Secuencia de péptidos de F3-2-2 del hidrolizado enzimático de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L®.

No	m/z	Secuencia de péptidos
1	1942,01	Leu-Thr-Val-Val-Gln-Ser-Pro-Phe-Glu-Val-Ser-Asn-Gly-Glu-Phe-Ile-Arg-Ile-Ala-Ser
2	1416,75	Leu-Ser-Phe-Ile-Pro-Asp-Asn-Leu- Gly-Ile-Asp-Ile-Thr
3	699,42	Ser-Val-Ser-Val-Thr-Ile-Leu + Dehydrated (S)
4	1329,65	Ser-Lys-Met-Asn-Glu-Gly-Asp-Val.Leu-Leu-Leu-Glu + Deamidated-N (N); Dehydrated (S)
5	1442,71	Ala-Pro-Asn-Asp-Pro-Asn-His-Pro-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile + Acetyl (K); Amidated (C-term); Deamidated-N (N)
6	845,46	Ile-Gly-Phe-Thr-Ser-Pro-Pro-Lys
7	774,37	Glu-Gly-Val-Asp-Val-Ala-Val-Ser
8	1272,59	Phe-Ser-Asn-Pro-Trp-Asp-Pro-Pro-Gln-Val-Pro-His-Ile
9	1292,641	Ala-Ser-Glu-Trp-Lys-Gln-Val-Glu-Pro-Leu-Thr + Acetyl (N-term); Dehydrated (S); Dehydrated (T)
10	1251,65	Gln-Thr-Lys-Thr-Ser-Ala-Thr-Ile-Asn-Ser-Lys-Ser + Acetyl (K); Amidated (C-term); Dehydrated (S); 2 Dehydrated (T)
11	938,54	Lys-Ile-Ala-Leu-Val-Ser-Asp-Gly-Ile + Acetil (K); Dehydrated (S)

Los radicales libres afectan tanto la salud humana como la calidad de los alimentos; en el cuerpo estos radicales inestables reaccionan fácilmente con macromoléculas biológicas como lípidos insaturados, ácidos nucleicos y carbohidratos, que pueden causar estrés oxidativo, generando muchos trastornos de salud como enfermedades neurodegenerativas, arteriosclerosis, cáncer,

diabetes mellitus e inflamatorias. enfermedades asociadas con lesiones tisulares (Wang et al., 2018). En los alimentos, la presencia de radicales libres provoca su oxidación que afecta directamente a la calidad de los alimentos por alteraciones de sabor, color, textura y pérdida de valor nutritivo (Tacias-Pascacio et al., 2020). Con los resultados obtenidos se observa un gran potencial en el uso de hidrolizado de hoja de yuca y sus fracciones como antioxidante en alimentos, toda vez que se ha reconocido que el uso de antioxidantes en la dieta es potencialmente eficaz para promover la salud humana al aumentar la carga de antioxidantes del cuerpo (Samaranayaka y Li-Chan, 2011b).

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Es posible obtener hidrolizados preparados con hoja de yuca que presenten actividad antioxidante, quelante de hierro y anticoagulante, usando Alcalasa 2,4L[®], Flavourzyme[®], Neutrasa 0,8L[®] y protamex[®]. Entre las enzimas evaluadas, la Alcalasa 2,4L[®] demostró producir hidrolizados con mayor eficiencia de recuperación de proteína, mayor actividad antioxidante y actividad anticoagulante.

Es posible realizar la extracción e hidrólisis de proteínas de la hoja de yuca mediante tratamiento directo con Alcalasa 2,4L[®], Flavourzyme[®], Neutrasa 0,8L[®] y protamex[®] sin requerir el aislamiento de la proteína.

La actividad antioxidante, proteína extraída (P) y el rendimiento de extracción de proteína (E) del extracto proteico de hoja de yuca dependen de la concentración de NaOH, sustrato y el tiempo empleado para la reacción.

La actividad antioxidante, el GH, la proteína extraída (P) y la eficiencia de extracción de proteínas (E) de los hidrolizados de hoja de yuca preparados con Alcalasa 2,4L[®], dependen del pH, la relación enzima/sustrato y el tiempo usado en la reacción.

La reducción de producción de ROS en células de musculo liso después del tratamiento con HHY y PHY sugirió su potencial para modular la función vascular y otros eventos cardiovasculares.

La hidrólisis de Alcalasa 2,4L[®] aumentó la actividad superficial en el hidrolizado de proteína de hoja de yuca, lo que indica que este podría ser un candidato potencial para aplicaciones como emulsificante.

La capacidad antioxidante de los hidrolizados de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2,4L[®] o sus fracciones, determinada por métodos químicos (FRAP, ABTS y ORAC) tiene correspondencia con su capacidad antioxidante en células de VSMC A7r5.

Los procesos de purificación mediante ultrafiltración, hidrofobicidad y RP-HPLC fueron efectivos para lograr la identificación de péptidos antioxidantes provenientes de la hoja de yuca, hasta el momento no se ha reportado péptidos provenientes de este material.

Los péptidos provenientes de hidrolizados enzimáticos de hoja de yuca presentaron actividad antioxidante *in vitro* y la capacidad de reducir la producción de ROS en células de VSMC A7r5.

Es posible dar un valor agregado a los subproductos agroindustriales, como la hoja de yuca, mediante la implementación de la hidrólisis enzimática con proteasas para obtener compuestos bioactivos que puedan ser usados en la industria de alimentos como ingredientes funcionales.

RECOMENDACIONES

6 RECOMENDACIONES

Se sugiere estudiar los factores que pueden influir en la concentración de polifenoles después de la hidrólisis, como las interacciones y enlaces polifenol-proteína y el tipo de enzima utilizada.

Sintetizar los péptidos bioactivos secuenciados con mayor actividad antioxidante y evaluar su actividad biológica *in vitro*, en líneas celulares y ensayos *in vivo*.

Estudiar el efecto de los hidrolizados y sus fracciones en otras líneas celulares con relevancia en el área médica.

Realizar estudios cinéticos de la hidrólisis enzimática.

Realizar estudios donde se incorpore el extracto alcalino e hidrolizado enzimático de hoja de yuca en matrices alimenticias para estudiar su efecto en las propiedades tecno-funcionales y antioxidante.

Realizar estudios donde se incorpore los hidrolizados de hoja de yuca en matrices alimenticias para estudiar su efecto antioxidante.

Evaluar la biodisponibilidad de la harina, proteínas y péptidos obtenidos mediante procesos de digestión gastrointestinal *in vitro* e *in vivo*.

Escalar el proceso a nivel de banco e industrial.

Estudiar la relación de la estructura de los péptidos con la actividad enzimática usando herramientas bioinformáticas.

Estudiar la viabilidad económica de producir extracto proteico e hidrolizados de hoja de yuca.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

7 DIFUSIÓN DE RESULTADOS

PUBLICACIONES

- Suarez, L.M., Fan, H., Zapata, J.E. et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis for Preparing Cassava Leaf Hydrolysate with Antioxidant Activity. *Food Bioprocess Technol* 14, 2181–2194 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02693-0>.
- Lina M. Suarez, Jairo G. Salcedo y José E. Zapata. Actividad biológica de hidrolizados de hoja de yuca variedad venezolana obtenidos con diferentes enzimas microbianas. *Información tecnológica*. volumen 33 número 2 (2022). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000200077>

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

- Study of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of cassava leaf protein. Modalidad: Oral. 2018. 2nd International Congress on Advances in Food Chemistry and Technology, Toronto-Canadá
- Extracción alcalina de la proteína de la hoja de yuca (*manihot esculenta crantz*) variedad venezolana. Modalidad poster, 2017. XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos- CIBIA, Valparaíso- Chile.
- Obtención del extracto proteico de hoja de yuca (*manihot esculenta crantz*) con actividad antioxidante. Modalidad poster, 2017. V Simposio Internacional Agroalimentario. Universidad del Atlántico, Barranquilla-Colombia.

- Obtención de extracto proteico de hojas de yuca (*manihot esculenta crantz*) con actividad antioxidante. Modalidad: Oral. 2017. Conferencia del CIDUA. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.
- Revalorización de la proteína de hojas de yuca (*manihot esculenta crantz*) por medio de hidrólisis enzimática. Modalidad: Oral. 2016. Avances en el desarrollo agroindustrial de los cultivos de yuca y ñame en el departamento de sucre.

REFERENCIAS

8 REFERENCIAS

- Achidi, A. U., Olufunmike A. A., Bussie M.D. y Mpoko, B. (2008). The Effect of Processing on the Nutrient Content of Cassava (*manihot esculenta crantz*) Leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(3), 486–502. doi: 10.1111/j.1745-4549.2007.00165.x
- Adegbola, P. I., Adewale A. y Temitope, D. O. (2020). Antioxidant Activity of Amaranthus Species from the Amaranthaceae Family – A Review. *South African Journal of Botany*, 133, 111–17. doi: 10.1016/j.sajb.2020.07.003
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier applied science publishers. UK.
- Aguilera, M. (2012). *La Yuca En El Caribe Colombiano: De Cultivo Ancestral a Agroindustrial*. (158). Cartagena, Colombia.
- Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Rodney J. M., Samson O. A., Mawson, A. J., He, R., Girgih, A. y Aluko, R. (2014). Antioxidant Properties of Australian Canola Meal Protein Hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500 – 506. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.081
- Alemán, A., Giménez, B. y Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp Residues to Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities of Peptide Sequences Isolated from Squid Gelatin Hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334–41. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.058
- Aletor, O. (2010). Comparative, Nutritive and Physico-Chemical Evaluation of Cassava (*manihot esculenta*) Leaf Protein Concentrate and Fish Meal. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8(2), 39–43.
- Alzate, A. M. (2009). Variabilidad Genética y Grado de Adopción de La Yuca (*manihot esculenta crantz*) Cultivada Por Pequeños Agricultores de La Costa Atlántica Colombiana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/22218>

Ambigaipalan, P. y Abdulrahman S. A. (2015). Antioxidant and Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Date Seed Protein Hydrolysates Prepared Using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–37. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.021

Anal, A. K. y Athapol N. (2013). Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides from Seafood and Crustacean Waste: Their Extraction, Bioactive Properties and Industrial Perspectives. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 709–35, doi: 10.1002/9781118375082.ch36

Anyanwu, C. N., Ibeto, C. N., Ezeoha, S. L. y Ogbuagu, N. J. (2015). Sustainability of Cassava (*manihot esculenta crantz*) as Industrial Feedstock, Energy and Food Crop in Nigeria. *Renewable Energy*, 81, 745–52. doi: 10.1016/j.renene.2015.03.075

Araya, H. y Lutz, M. (2003). “Alimentos funcionales y saludables. *Revista Chilena de Nutrición*, 30(1), 8–14. doi: 10.4067/S0717-75182003000100001

Aristizábal, J., Sánchez, T. y Mejía, D. (2007). Guía Técnica Para Producción y Análisis de Almidón de Yuca. Vol. 163. doi: 9253056770-9789253056774

Ayodeji, F. (2005). Nutrient Composition and Processing Effects on Cassava Leaf (*manihot esculenta crantz*) Antinutrients. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(1), 37–42. doi: 10.3923/pjn.2005.37.42

Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M y Nunes, M. L. (2010). Characterization of Protein Hydrolysates and Lipids Obtained from Black Scabbardfish (*Aphanopus Carbo*) by-Products and Antioxidative Activity of the Hydrolysates Produced. *Process biochemistry*, 45, 18–24. doi: 10.1016/j.procbio.2009.07.019

Benhammouche, T., Melo, A., Martins, Z., Faria, M., Pinho, S., Ferreira, I. y Zaidi, F. (2021). Nutritional Quality of Protein Concentrates from Moringa Oleifera Leaves and in Vitro Digestibility. *Food Chemistry*, 348, 128858. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128858

Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). “Hidrolizados de Proteína: Procesos y Aplicaciones.” *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–36.

di Bernardini, R., Rai, D. K., Bolton, D., Eileen, J. K., Mullen, A. M., Harnedy, P. y Hayes, M. (2011). Isolation, Purification and Characterization of Antioxidant Peptidic Fractions from a Bovine Liver Sarcoplasmic Protein Thermolysin Hydrolyzate. *Peptides*, 32(2), 388–400. doi: 10.1016/j.peptides.2010.11.024

Bessada, S. M., João, F., Barreira, C. M. y Beatriz, M., Oliveira, P. P. (2019). Pulses and Food Security: Dietary Protein, Digestibility, Bioactive and Functional Properties. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 53–68.

Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-derouiniot, M. y Massé, A. (2009). Fractionation of Fish Protein Hydrolysates by Ultrafiltration and Nanofiltration: Impact on Peptidic Populations. *DES*, 244(1–3), 303–20. doi: 10.1016/j.desal.2008.05.026

Braspaiboon, S., Sukhuntha, O., Prasit, P., y Wachira, J. (2020). Comparison of the Effectiveness of Alkaline and Enzymatic Extraction and the Solubility of Proteins Extracted from Carbohydrate-Digested Rice. *Heliyon*, 6(11), 05403. doi: 10.1016/J.HELİYON.2020.E05403

Bunzel, M., Schübler, A. y Tchetsseubu, G. (2011). Chemical Characterization of Klason Lignin Preparations from Plant-Based Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12506–13. doi: 10.1021/jf2031378

Calderón -Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E. y Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Jackfruit (*artocarpus heterophyllus lam*) Leaf as a New Source to Obtain Protein Hydrolysates: Physicochemical Characterization, Techno-Functional Properties and Antioxidant Capacity. *Food Hydrocolloids*, 112, 106319. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106319

Canabady-rochelle, L., Selmeczi, K., Collin, S., Pasc, A. y Muhr, L. (2018). SPR Screening of Metal Chelating Peptides in a Hydrolysate for Their Antioxidant Properties. *Food Chemistry*, 239, 478–85. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.116

Castellanos, R., Altamirano, S. B. y Moretti, R. H. (1994). Nutritional Characteristics of Cassava (*manihot esculenta crantz*) Leaf Protein Concentrates Obtained by Ultrafiltration and Acidic Thermocoagulation. *Plant Foods Jbr Human Nutrition*, 45, 357–63.

de Castro, R. J. S., Granato, V. y Harumi, H. (2017). Binary Mixture of Proteases Increases the Antioxidant Properties of White Bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) Protein-Derived Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 291–97. doi: 10.1016/j.bcab.2017.04.003

de Castro, R. J. S. y Harumi, H. (2015). Biologically Active Peptides: Processes for Their Generation, Purification and Identification and Applications as Natural Additives in the Food and Pharmaceutical Industries. *Food Research International*, 74, 185–98. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.013

Chahyadi, A. y Elfahmi. (2020). The Influence of Extraction Methods on Rutin Yield of Cassava Leaves (*manihot esculenta crantz*). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(11), 1466–73. doi: 10.1016/j.jsps.2020.09.012

Chaiareekitwat, S., Latif, S., Mahayothee, B., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., Amawan, S. y Müller, J. (2022). Protein Composition, Chlorophyll, Carotenoids, and Cyanide Content of Cassava Leaves (*manihot esculenta crantz*) as Influenced by Cultivar, Plant Age, and Leaf Position. *Food Chemistry*, 372, 131173. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.131173

Chen, J., Liu, S., Ye, R., Cai, G., Ji, B. y W, Y. (2013). Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Tripeptides from Rice Protein Hydrolysate: Purification and Characterization. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1684–92. doi: 10.1016/j.jff.2013.07.013

Cheung, I. W. Y., Cheung, L. K. Y., Tan, N. Y. y Li-Chan, E. C. Y. (2012). The Role of Molecular Size in Antioxidant Activity of Peptide Fractions from Pacific Hake (*merluccius productus*) Hydrolysates. *Food Chemistry*, 134(3), 1297–1306. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.215

Chomnawang, C. y Yongsawatdigul, J. (2013). Product Protein Recovery of Tilapia Frame By- Products by PH-Shift Method. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(2), 112–20. doi: 10.1080/10498850.2011.629077

Cian, R. E., Vioque, J. y Drago, S. R. (2015). Structure-Mechanism Relationship of Antioxidant and ACE I Inhibitory Peptides from Wheat Gluten Hydrolysate Fractionated by PH. *Food Research International*, 69, 216–23. doi: 10.1016/j.foodres.2014.12.036

Coelho, M., y Salas-Mellado, M. (2018). How Extraction Method Affects the Physicochemical and Functional Properties of Chia Proteins. *LWT*, 96, 26–33. doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.010

Coldebella, P. F., Gomes, S. D., Evarini, J.A., Cereda, M. P., Coelho, S. R. M. y Coldebella, A. (2013). Evaluation of Protein Extraction Methods to Obtain Protein Concentrate from Cassava Leaf. *Engenharia Agrícola*, 33(6), 1223–33. doi: 10.1590/S0100-69162013000600015

Connolly, A., Cermeño, M., Crowley, D., Callaghan, Y. O., Brien, N. M. y Fitzgerald, R. J. (2019). Characterisation of the in Vitro Bioactive Properties of Alkaline and Enzyme Extracted Brewers' Spent Grain Protein Hydrolysates. *Food Research International*, 121, 524–32. doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.008

CORPOICA, CLAYUCA y CIAT. (1986). Nuevas Variedades de Yuca Para Uso Industrial En La Región Caribe Colombiana. Cali, Colombia.

da Cruz, C. Z., de Mendonça, R. J., Souza, L. H., dos Santos Ramos, M., Garrido, S. S., Veloso de Paula, A., Monti, R. y Massolini, G. (2020). Assessment of the Bioactive Potential of Cheese Whey Protein Hydrolysates Using Immobilized Alcalase. *Food and Bioprocess Technology*, 13(12), 2120–30. doi: 10.1007/s11947-020-02552-4

Cui, Q., NI, X., Zeng, L., Tu, Z., Li, J., Sun, K., Chen, X. and Li, X. (2017). Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. *Horticultural Plant Journal*, 3(4), 172–76. doi: 10.1016/j.hpj.2017.06.003

Baker, D. (1977). Determining Fiber in Cereals. *Cereal Chemistry*, 54(2), 360–65.

Daliri, H., Ahmadi, R., Pezeshki, A., Hamishehkar, H., Mohammadi, M., Beyrami, H., Heshmati, M. K. y Ghorbani, M. (2021). Quinoa Bioactive Protein Hydrolysate Produced by Pancreatin Enzyme- Functional and Antioxidant Properties. *LWT*, 150, 111853. doi: 10.1016/J.LWT.2021.111853

Herminia, D. y Parajo, J. C. (2006). Antioxidant Properties of Ultrafiltration-Recovered Soy Protein Fractions from Industrial Effluents and Their Hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41, 447–56. doi: 10.1016/j.procbio.2005.07.014

- Agata, D., Baraniak, B., Jakubczyk, A. y Świeca, M. (2013). Biologically Active Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Adzuki Bean Seeds. *Food Chemistry*, 141(3), 2177–83. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.012
- Elmalimadi, M. B., Jovanovi, J. R., Stefanovi, A. B., Jakoveti, S., Djurovi, S. B. y Bugarski, B. M. (2017). Controlled Enzymatic Hydrolysis for Improved Exploitation of the Antioxidant Potential of Wheat Gluten. *Industrial Crops and Products*, 109, 548–57. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.008
- Esfandi, R., Willmore, W. G. y Tsopmo, A. (2019). Peptidomic Analysis of Hydrolyzed Oat Bran Proteins, and Their in Vitro Antioxidant and Metal Chelating Properties. *Food Chemistry*, 279, 49–57. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.110
- Esteve, C., Marina, M. L. y García, M. C. (2015). Novel Strategy for the Revalorization of Olive (*olea europaea*) Residues Based on the Extraction of Bioactive Peptides. *Food Chemistry*, 167, 272–80. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.090
- Fan, H., Xu, Q., Hong, H. y Wu, J. (2018). Stability and Transport of Spent Hen-Derived ACE-Inhibitory Peptides IWHHT, IWH, and IW in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(43), 11347–11354. doi: 10.1021/acs.jafc.8b03956
- Fan, H., Yu, W., Liao, W. y Wu, J. (2020). Spent Hen Protein Hydrolysate with Good Gastrointestinal Stability and Permeability in Caco-2 Cells Shows Antihypertensive Activity in SHR. *Foods*, 9(10), 1384. doi: 10.3390/foods9101384
- FAO. (2019). Datos Agrícolas de FAOSTAT. Producción. Cultivos (Yuca). En Base de Datos Estadísticos de La FAO (FAOSTAT). Retrieved (<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>).
- Fathollahy, I., Farmani, J., Reza, M. y Hamishehkar, H. (2021). Characteristics and Functional Properties of Persian Lime (*citrus latifolia*) Seed Protein Isolate and Enzymatic Hydrolysates. *LWT*, 140, 110765. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110765
- Fazeli M., Ezatollah, H., Tadevosyan, A., Fallahi, E. y Goodarzi, R. (2016). Nutritional Factors and Metabolic Variables in Relation to the Risk of Coronary Heart Disease: A Case

Control Study in Armenian Adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11(1), 7-11. doi: 10.1016/j.dsx.2016.06.013

FDA. (1997). *Cultivo de Yuca*. 31. Republica Dominicana.

Fischnaller, M., Köck, R., Bakry, R. y Bonn, G. K. (2014). Enrichment and Desalting of Tryptic Protein Digests and the Protein Depletion Using Boron Nitride. *Analytica Chimica Acta*, 823, 40–50. doi: 10.1016/j.aca.2014.03.008

Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M. y Aider, M. (2016). Study of Total Dry Matter and Protein Extraction from Canola Meal as Affected by the PH, Salt Addition and Use of Zeta-Potential/Turbidimetry Analysis to Optimize the Extraction Conditions. *Food Chemistry*, 201, 243–52. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.074

Giraldo, A., Velasco, R. J. y Villada, H. S. (2008). Digestibilidad Aparente de Una Harina Proveniente de Hojas de Yuca (*manihot esculenta crantz*). *Información Tecnológica*, 19(1), 11–18. doi: 10.4067/S0718-07642008000100003

Gómez, L. J., Figueroa, O. A. y Zapata, J. E. (2013). Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos Por Efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Informacion Tecnológica*, 24(1), 33–42. doi: 10.4067/S0718-07642013000100005

Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., López-García, G., Cilla, A. y Alegría, A. (2019). In-Vitro Antioxidant Capacity and Cytoprotective/Cytotoxic Effects upon Caco-2 Cells of Red Tilapia (*oreochromis Spp.*) Viscera Hydrolysates. *Food Research International*, 120, 52–61. doi: 10.1016/J.FOODRES.2019.02.029

Gómez, L. J. y Zapata, J. E. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1), 101–9.

Gómez, L. J. y Zapata, J. E. (2014). Effects of Hydrolysis and Digestion in Vitro on the Activity of Bovine Plasma Hydrolysates as Inhibitors of the Angiotensin I Converting Enzyme. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3), 386–93. doi: 10.1590/S1516-89132014005000004

- González, E., Marina, M. L. y Concepción, M. (2014). Plum (*prunus domestica L.*) by-Product as a New and Cheap Source of Bioactive Peptides: Extraction Method and Peptides Characterization. *Journal of Functional Foods*, 11, 428–37. doi: 10.1016/j.jff.2014.10.020
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez, M. P., González, P. y Camacho, F. (2000). Procesos Tecnológicos y Métodos de Control En La Hidrólisis de Proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89. doi: 10.4067/S0718-09342007000200003
- Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S. y Zhao, X. (2013). Preparation, Isolation and Identification of Iron-Chelating Peptides Derived from Alaska Pollock Skin. *Process Biochemistry*, 48(5–6), 988–93. doi: 10.1016/j.procbio.2013.04.013
- Harnedy, P. A., y FitzGerald, R. J. (2013). Extraction of Protein from the Macroalga *Palmaria Palmata*. *LWT*, 51(1), 375–82. doi: 10.1016/j.lwt.2012.09.023
- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X. y Aluko, R. E. (2013). Antioxidant Activities of Enzymatic Rapeseed Protein Hydrolysates and the Membrane Ultrafiltration Fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219–27. doi: 10.1016/j.jff.2012.10.008
- Heffernan, S., Giblin, L. y Brien, N. O. (2021). Assessment of the Biological Activity of Fish Muscle Protein Hydrolysates Using In vitro Model Systems. *Food Chemistry*, 359, 129852. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129852
- Ho, T., Kiddane, A. T., Sivagnanam, S. P., Park, J. S., Cho, Y. J., Getachew, A. T., Thi, T. T., Kim, G. y Chun, B.S. (2020). Green Extraction of Polyphenolic-Polysaccharide Conjugates from *Pseuderanthemum Palatiferum* (Nees) Radlk: Chemical Profile and Anticoagulant Activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 484–93. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.113
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M. y Wu, J. (2019). Preparation of Low-Molecular-Weight, Collagen Hydrolysates (Peptides): Current Progress, Challenges, and Future Perspectives. *Food Chemistry*, 301, 125222. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125222
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Wu, J. (2012). Antioxidative and Functional Properties of Protein Hydrolysate from Defatted Skipjack (*katsuwonous pelamis*) Roe. *Food Chemistry*, 135(4), 3039–48. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.076

Ishak, N. H. y Sarbon, N. M. (2018). A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 2–16. doi: 10.1007/s11947-017-1940-1

Jain, S. y Kumar, A. (2016). Optimization of Extraction of Functional Protein Hydrolysates from Chicken Egg Shell Membrane (ESM) by Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) and Enzymatic Hydrolysis. *LWT*, 69, 295–302. doi: 10.1016/J.LWT.2016.01.057

Jakobek, L. (2015). Interactions of Polyphenols with Carbohydrates, Lipids and Proteins. *Food Chemistry*, 175(15), 556–67. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013

Jayalakshmi, A., Rajesh, S. y Mohan, D. (2012). Fouling Propensity and Separation Efficiency of Epoxidated Polyethersulfone Incorporated Cellulose Acetate Ultrafiltration Membrane in the Retention of Proteins. *Applied Surface Science*, 258(24), 9770–81. doi: 10.1016/j.apsusc.2012.06.028

Jehmlich, N., Golatowski, C., Murr, A., Salazar, G., Mukund, V., Hammer, E. y Völker, U. (2014). Comparative Evaluation of Peptide Desalting Methods for Salivary Proteome Analysis. *Clinica Chimica Acta*, 434, 16–20. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.003

Jin, D., Liu, X., Zheng, X., Wang, X. y He, J. (2016). Preparation of Antioxidative Corn Protein Hydrolysates, Purification and Evaluation of Three Novel Corn Antioxidant Peptides. *Food Chemistry*, 204, 427–36. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.119

Kannan, A., Hettiarachchy, N.S., Lay, J. O. y Liyanage, R. (2010). Human Cancer Cell Proliferation Inhibition by a Pentapeptide Isolated and Characterized from Rice Bran. *Peptides*, 31(9), 1629–34. doi: 10.1016/j.peptides.2010.05.018

Kelly, R. K., Thomson, R., Smith, K. J., Dwyer, T., Venn, A. y Magnussen, C. G. (2015). Factors Affecting Tracking of Blood Pressure from Childhood to Adulthood: The Childhood Determinants of Adult Health Study. *The Journal of Pediatrics*, 167(6), 1422-1428. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.07.055

Kesavan, R., Potunuru, U. R., Nastasijević, B., Avaneesh T., Joksić, G. y Dixit, M. (2013). Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by *Gentiana Lutea* Root Extracts. *PLoS ONE*, 8(4), 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0061393

- Kim, W., Wang, Y. y Selomulya, C. (2020). Dairy and Plant Proteins as Natural Food Emulsifiers. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 261–72. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.012
- Kimatu, B. M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F. y Hu, Q. (2017). Antioxidant Potential of Edible Mushroom (*agaricus bisporus*) Protein Hydrolysates and Their Ultrafiltration Fractions. *Food Chemistry*, 230, 58–67. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.030
- King, C., McEniry, J., O’Kiely, P. and Richardson, M. (2012). The Effects of Hydrothermal Conditioning, Detergent and Mechanical Pressing on the Isolation of the Fibre-Rich Press-Cake Fraction from a Range of Grass Silages. *Biomass and Bioenergy*, 42, 179–88. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.03.009
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H. y Wang, X. (2013). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Chickpea (*cicer arietinum L.*) Albumin Hydrolysates. *LWT*, 50(2), 591–98. doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.002
- Ktari, N., Slama-Ben, R., Bkhairia, I., Slima, S., Nasri, R., Salah, R. y Nasri, M. (2020). Functional Properties and Biological Activities of Peptides from Zebra Blenny Protein Hydrolysates Fractionated Using Ultrafiltration. *Food Bioscience*, 34, 1–10. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100539
- Kulczyk, A., Karamac, M. y Kosińska-Cagnazzo, A. (2016). Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1027. doi: 10.3390/ijms17071027
- Kumar, M., M. Tomar, Reetu, J. P., Punia, S., Dhakane, J., Singh, S., Dhumal, S., Chandra, P., Bhushan, B., Anitha, T., Alajil, O., Alhariri, A., Amarowicz, R. y Kennedy, J. F. (2021). Functional Characterization of Plant-Based Protein to Determine Its Quality for Food Applications. *Food Hydrocolloids*, 123, 106986. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106986
- Lam, R. S. H. y Nickerson, M. T. (2013). Food Proteins: A Review on Their Emulsifying Properties Using a Structure-Function Approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–84. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.038

Latif, S., y Müller, J. (2015). Potential of Cassava Leaves in Human Nutrition: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 147–58. doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.006

Laya, A., y Koubala, B. B. (2020). Polyphenols in Cassava Leaves (*manihot esculenta crantz*) and Their Stability in Antioxidant Potential after in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Heliyon*, 6(3), 03567. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03567

León, E. B., Jiménez, C. y Davila, G. (2015). Péptidos Bioactivos de Fuentes Vegetales: Un Nuevo Ingrediente Para Alimentos Funcionales. Pp. 37–71 in *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos.*, edited by M. E. Ramírez-Ortiz. Barcelona, España: OmniaScience.

Li, M., Xia, S., Zhang, Y. y Li, X. (2018). Optimization of ACE Inhibitory Peptides from Black Soybean by Microwave- Assisted Enzymatic Method and Study on Its Stability. *LWT*, 98, 358–65. doi: 10.1016/j.lwt.2018.08.045

Li, Mo, Wen, X., Peng, Y., Wang, Y., Wang, K. y Ni, Y. (2018). Functional Properties of Protein Isolates from Bell Pepper (*capsicum annuum l. var. annuum*) Seeds. *LWT*, 97, 802–10. doi: 10.1016/j.lwt.2018.07.069

Li, Y., He, D., Li, B., Lund, M. N., Xing, Y., Wang, Y., Li, F., Cao, X., Liu, Y., Chen, X., Yu, J., Zhu, J., Zhang, M., Zhang, Y., Li, B., Wang, J., Xing, X. y Li, L. (2021). Engineering Polyphenols with Biological Functions via Polyphenol-Protein Interactions as Additives for Functional Foods. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 470–82. doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.009

Liang, M., Liang, S., Zeng, Z. y Yu, B. (2016). Kind of Microwave-Assisted Membrane Filtration Method for Preparing Mulberry Leaf Protein Polypeptide. CN105368906A. China.

Liao, W., Chakrabarti, S., Davidge, S. T. y Wu, J. (2016). Modulatory Effects of Egg White Ovotransferrin-Derived Tripeptide IRW (Ile-Arg-Trp) on Vascular Smooth Muscle Cells against Angiotensin II Stimulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(39), 7342–47. doi: 10.1021/acs.jafc.6b03513

- Lin, Q., Liao, W., Bai, J., Wu, W. y Wu, J. (2017). Soy Protein-Derived ACE-Inhibitory Peptide LSW (Leu-Ser-Trp) Shows Anti-Inflammatory Activity on Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Functional Foods*, 34, 248–53. doi: 10.1016/j.jff.2017.04.029
- Lund, M. N. (2021). Trends in Food Science & Technology Reactions of Plant Polyphenols in Foods: Impact of Molecular Structure. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 241–51. doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.056
- Ma, M., Bae, Y., Gyu, H. y Yang, C. (2006). Purification and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Buckwheat (Moench). *Food Chemistry*, 96(1), 36–42. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.052
- Maejima, Y., Nakatsugawa, H., Ichida, D., Maejima, M., Aoyagi, Y., Maoka, T. y Etoh, H. (2011). Functional Compounds in Fermented Buckwheat Sprouts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(9), 1708–12. doi: 10.1271/bbb.110241
- Maestri, E., Marmiroli, M., y Marmiroli, N. (2016). Bioactive Peptides in Plant-Derived Foodstuffs. *Journal of Proteomics*, 147, 140 – 155. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.048
- Manjula, P., Lalitha, K., Vengateswari, G., Patil, J., Senthil, S. y Subramanian, M. (2020). Effect of *Manihot Esculenta* (*crantz*) Leaf Extracts on Antioxidant and Immune System of *Spodoptera Litura* (*lepidoptera: noctuidae*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101476. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101476
- Manshui, L., Bingni, Y., Shangwen, L. y Zhiliang, Z. (2016). Assisted Method for Preparing Cassava Leaf Protein Polypeptide Microwave. CN105368906A, China.
- Marson, G., Soares, R. J., Teixeira, M., da Silva, F., Queiroz, H. D., Maróstica, M. R., Sussulini, A. y Dupas, M. (2019). Proteolytic Enzymes Positively Modulated the Physicochemical and Antioxidant Properties of Spent Yeast Protein Hydrolysates. *Process Biochemistry*, 91, 34-45. doi: 10.1016/j.procbio.2019.11.030
- McClellan, S., Beggs, L. B. y Welch, R. W. (2014). Antimicrobial Activity of Antihypertensive Food-Derived Peptides and Selected Alanine Analogues. *Food Chemistry*, 146, 443–47. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.094

Meilawaty, Z. y Kusumawardani, B. (2016). Effect of Cassave Leaf Flavonoid Extract on TNF- α Expressions in Rat Models Suffering from Periodontitis. *Dental Journal*, 49(3), 137. doi: 10.20473/j.djmk.v49.i3.p137-142.

Mejia, M. (2002). Fisiología de La Yuca (*manihot esculenta crantz*). La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Ministerio de agricultura y Desarrollo rural. (2018). AGRONET. Retrieved (<http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>).

Modesti, C., Duarte, A., Domingos, E., Patto, C. M. y Donizete, C. (2007). Caracterização de Concentrado Protéico de Folhas de Mandioca Obtido Por Precipitação Com Calor e Ácido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(3), 464–69. doi: 10.1590/S0101-20612007000300007

Momen, S., Alavi, F. y Aider, M. (2021). Alkali-Mediated Treatments for Extraction and Functional Modification of Proteins: Critical and Application Review. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 778–97. doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.052

Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. Nueva Jersey, Estados Unidos, John wiley & sons.

Morales, J. A. y Figueroa, O. A. (2017). Optimización de Hidrólisis Enzimática de La Fracción Globular de Sangre Bovina Por Metodología de Superficie Respuesta y Evaluación de Sus Propiedades Antioxidantes Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Bovine Blood Cell Fraction by Response Surface Met. *Inf. Tecnol*, 28(2), 75–86. doi: 10.4067/S0718-07642017000200009

Mustarichie, R., Sulistyaningsih, S. y Runadi, D. (2020). Antibacterial Activity Test of Extracts and Fractions of Cassava Leaves (*manihot esculenta crantz*) against Clinical Isolates of Staphylococcus Epidermidis and Propionibacterium Acnes Causing Acne. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-20. doi: 10.1155/2020/1975904

Naseri, A., Marinho, G. S., Holdt, S. L., Bartela, J. M. y Jacobsen, C. (2020). Enzyme-Assisted Extraction and Characterization of Protein from Red Seaweed *Palmaria Palmata*. *Algal Research*, 47, 101849. doi: 10.1016/J.ALGAL.2020.101849

- Ng, K. L., Ayob, M. K., Said, M., Osman, M. A. y Ismail, A. (2013). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Palm Kernel Cake Protein (PKCP) for Producing Hydrolysates with Antiradical Capacity. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 725–31. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.017
- Ngudi, D. D., Kuo, Y. H. y Lambein, F. (2003). Cassava Cyanogens and Free Amino Acids in Raw and Cooked Leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 41(8), 1193–97. doi: 10.1016/S0278-6915(03)00111-X
- Nguyen, T. H. L., Le, D. N., Wilhelmus, M., Verstegen, A. y Hendriks, W. H. (2012). Pig Performance Increases with the Addition of DL-Methionine and L-Lysine to Ensiled Cassava Leaf Protein Diets. *Tropical Animal Health and Production*, 44(1), 165–72. doi: 10.1007/s11250-011-9904-3
- Njankouo, Y., Mounjouenpou, P., Kansci, G., Kenfack, M. J., Fotso, M. P., Ngonu, N. S. N., Akhobakoh, M. M. y Nyegue, A. (2019). Influence of Cultivars and Processing Methods on the Cyanide Contents of Cassava (*manihot esculenta crantz*) and Its Traditional Food Products. *Scientific African*, 5, 00119. doi: 10.1016/j.sciaf.2019.e00119
- Noman, A., Xu, Y., Al-bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A.H. y Xia, W. (2018). Influence of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Degree of Hydrolysis and Functional Properties of Protein Hydrolysate Obtained from Chinese Sturgeon (*acipenser sinensis*) by Using Papain Enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19–28. doi: 10.1016/j.procbio.2018.01.009
- Olagunju, A. I., Omoba, O. S., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M. y Aluko, R. E. (2018). Pigeon Pea Enzymatic Protein Hydrolysates and Ultrafiltration Peptide Fractions as Potential Sources of Antioxidant Peptides: An in Vitro Study. *LWT*, 97(2), 69–78. doi: 10.1016/j.lwt.2018.07.003
- Oludare, F. A. (2006). Protein Replacement Value of Cassava (*manihot esculenta crantz*) Leaf Protein Concentrate (CLPC): Effects on Egg Quality, Biochemical and Hematological Indices in Laying Birds. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 4(2), 54–59.

Omura, M. H., Hanke, A. P., Souza, L., dos Reis, J. S., Ribeiro, F. A., Teixeira, M. C., Baracat-Pereira, M. C. y Basílio, E. (2021). Effects of Protein Concentration during Ultrasonic Processing on Physicochemical Properties and Techno-Functionality of Plant Food Proteins. *Food Hydrocolloids*, 113, 106457. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106457

Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E. y Kjos. (2015). Hydrolysis of Atlantic Salmon (*salmo salar*) Rest Raw Materials—Effect of Raw Material and Processing on Composition, Nutritional Value, and Potential Bioactive Peptides in the Hydrolysates. *Process Biochemistry*, 50(8), 1247–1257. doi: 10.1016/j.procbio.2015.04.017

Ospina, B., y Ceballos, H. (2002). La Yuca En El Tercer Milenio. Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. 327th ed. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Ozdal, T., Capanoglu, E. y Altay, F. (2013). A Review on Protein-Phenolic Interactions and Associated Changes. *Food Research International*, 51(2), 954–70. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.009

Parrado, J., Bautista, J. D. y Tejada, M. (2012). Obtaining a protein extract through enzymatic hydrolysis from tobacco leaves and its application as a fertilizer, ES2393683A1, España.

Pérez-gálvez, R., Almécija, M. C., Espejo, F. J., Guadix, E. M. y Guadix, A. (2011). Bi-Objective Optimisation of the Enzymatic Hydrolysis of Porcine Blood Protein. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 305–10. doi: 10.1016/j.bej.2010.12.004

Perović, M. N., Knežević, Z. D. y Antov, M. G. (2020). Improved Recovery of Protein from Soy Grit by Enzyme-Assisted Alkaline Extraction. *Journal of Food Engineering*, 276, 109894. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894

Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-p, M., Jaouen, P., Chaplain-derouiniot, M., Piot, J., Batista, I., Pires, C., Berg, J., Delannoy, C., Jakobsen, G. y Bourseau, P. (2010). Impact of Ultrafiltration and Nanofiltration of an Industrial Fish Protein Hydrolysate on Its Bioactive. *J Sci Food Agric*, 90(11), 1819–26. doi: 10.1002/jsfa.4020

Poonsri, T., Jafarzadeh, S., Ariffin, F. y Abidin, S. Z. (2019). Improving Nutrition, Physicochemical and Antioxidant Properties of Rice Noodles with Fiber and Protein-Rich

Fractions Derived from Cassava Leaves. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(4), 325–32. doi: 10.12691/jfnr-7-4-10

Prieto, C. A., Guadix, E. M. y Guadix, A. (2008). Influence of Temperature on Protein Hydrolysis in a Cyclic Batch Enzyme Membrane Reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 217–23. doi: 10.1016/j.bej.2008.06.018

Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L. y Moresoli, C. (2013). Production of Antioxidant Soy Protein Hydrolysates by Sequential Ultrafiltration and Nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 429, 81–87. doi: 10.1016/j.memsci.2012.10.040

Ravindran, G. (1988). Changes in the Nutritional Composition of Cassava (*manihot esculenta crantz*) Leaves during Maturity. *Food Chemistry*, 27(4), 299–309. doi: 10.1016/0308-8146(88)90014-3

Rosa, M. J. S., Ferreira, R. B. y Teixeira, A. R. (2000). Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5432–5439. <https://doi.org/10.1021/jf000447r>

Roslan, J., Mazlina, S., Kamal, M. y Abdullah, N. (2014). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Muscle (*oreochromis niloticus*) Using Response Surface Methodology (RSM). *Sains Malaysiana*, 43(11), 1715–1723.

Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. y Amar, R. (2014). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65(C), 453–461. doi: 10.1016/j.foodres.2014.04.026

Samaranayaka, A. G. P. y Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–54. doi: 10.1016/j.jff.2011.05.006

Santamaría-Fernández, M., y Lübeck, M. (2020). Production of Leaf Protein Concentrates in Green Biorefineries as Alternative Feed for Monogastric Animals. *Animal Feed Science and Technology*, 268, 114605. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114605

Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P. M. y Bruins, M. E. (2015). How Biomass Composition Determines Protein Extractability. *Industrial Crops and Products*, 70, 125–33. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.020

Sarmadi, B. H. y Ismail, A. (2010). Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. *Peptides*, 31(10), 1949–56. doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.020

Sayed, E. T., Wilberforce, T., Elsaid, K., Kamal, M., Rabaia, H., Ali, M., Chae, K. y. Olabi, A. G. (2020). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. *Int J Biol Macromol.*, 183, 2262-2271. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.181

Shahi, Z., Sayyed-alangi, S. Z. y Naja, L. (2020). Effects of Enzyme Type and Process Time on Hydrolysis Degree, Electrophoresis Bands and Antioxidant Properties of Hydrolyzed Proteins Derived from Defatted Bunium Persicum Bioss. Press Cake. *Heliyon*, 6(2), 03365. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03365

Shahidi, F. y Zhong, Y. (2015). Measurement of Antioxidant Activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–81. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047

Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y. y Chen, J. (2008). Studies on Tea Protein Extraction Using Alkaline and Enzyme Methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929–38. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.047

Shi, D., He, Z. y Qi, W. (2005). Lumping Kinetic Study on the Process of Tryptic Hydrolysis of Bovine Serum Albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949. doi: 10.1016/j.procbio.2004.07.009

Sila, A. y Bougatef, A. (2016). Antioxidant Peptides from Marine By-Products: Isolation, Identification and Application in Food Systems. A Review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26. doi: 10.1016/j.jff.2015.11.007

Silva, F. G.D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M. y Miralles, B. (2017). Identification of Peptides Released from Flaxseed (*linum usitatissimum*) Protein by Alcalase® Hydrolysis: Antioxidant Activity. *LWT*, 76, 140–46. doi: 10.1016/J.LWT.2016.10.049

da Silva, J. L., Gomes, S. D., Machado, S. R., Evarini, J., Ferri, P., Pascoli, M. y Dal Maso Lucas, S. (2012). Protein Concentrate Obtainment from Leaves and Aerial Part Cassava (*manihot esculenta crantz*). *Semina: Ciencias Agrarias*, 33(6), 2279–87. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n6p2279

Silveira, M., de Araujo, S., Machado, J. y Salas-Mellado, M. (2019). In Vitro and in Vivo Antioxidant Capacity of Chia Protein Hydrolysates and Peptides. *Food Hydrocolloids*, 91, 19–25. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.018

Singh, T., Siddiqi, R. A. y Sogi, D. (2019). Statistical Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Rice Bran Protein Concentrate for Enhanced Hydrolysate Production by Papain. *LWT*, 99, 77–83. doi: 10.1016/j.lwt.2018.09.014

Soest, P. J. Y Wine, R. H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *Journal of AOAC international*, 50(1), 50–55. doi: 10.1093/jaoac/50.1.50

Sofi, N. Y., Jain, M., Kapil, U., Seenu, V., Kamal, V. K. y Pandey, R. M. (2016). Nutritional Risk Factors and Status of Serum 25(OH)D Levels in Patients with Breast Cancer: A Case Control Study in india. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, 55-59. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.09.020

Sridhar, K., Inbaraj, B. S. y Chen, B. (2021). Recent Developments on Production, Purification and Biological Activity of Marine Peptides. *Food Research International*, 147, 110468. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110468

Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A. y Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the Production of Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–96. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.060

Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S. y Hu, H. (2020). Ultrasonic Emulsification: An Overview on the Preparation of Different Emulsifiers-Stabilized Emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 363–77. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.024

Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M. y Chen, J. (2010). Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 587–93. doi: 10.1021/jf9028656

Tao, H. T., Qiu, B., Du, F. L., Xu, T. C., Liu, L. N., Lü, F., Li, K. M. y Liu, W. (2015). The Protective Effects of Cassava (*manihot esculenta crantz*) Leaf Flavonoid Extracts on Liver Damage of Carbon Tetrachloride Injured Mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(1), 52–56. doi: 10.4314/ajtcam.v12i1.8

Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S. y Vardhanabhuti, B. (2016). Identification of Peptide Molecular Weight from Rice Bran Protein Hydrolysate with High Antioxidant Activity. *Journal of Cereal Science*, 69, 329–35. doi: 10.1016/J.JCS.2016.04.011

Tkaczewska, J. (2020). Peptides and Protein Hydrolysates as Food Preservatives and Bioactive Components of Edible Films and Coatings - A Review. *Trends in Food Science and Technology*, 106, 298–311. doi: 10.1016/j.tifs.2020.10.022

Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M. y Mickowska, B. (2020). The Effects of Hydrolysis Condition on the Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate from *cyprinus carpio* Skin Gelatin. *LWT*, 117, 108616. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108616

Torres-Fuentes, C., Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M. and Vioque, J. (2015). Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194–202. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.046

Tsumbu, C. N., Deby-Dupont, G., Tits, M., Angenot, L., Franck, T., Serteyn, D. y Mouithys-Mickalad, A. (2011). Antioxidant and Antiradical Activities of *manihot esculenta crantz* (*euphorbiaceae*) Leaves and Other Selected Tropical Green Vegetables Investigated on Lipoperoxidation and Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) Activated Monocytes. *Nutrients*, 3(9), 818–38. doi: 10.3390/nu3090818

Urbizo-Reyes, U., San Martin-González, M. F., Garcia-Bravo, J., López, A. y Liceaga, A. M. (2019). Physicochemical Characteristics of Chia Seed (*salvia hispanica*) Protein

Hydrolysates Produced Using Ultrasonication Followed by Microwave-Assisted Hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 97, 105187. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105187

Urribarrí, L., Chacón, D., González, O. y Ferrer, A. (2009). Protein Extraction and Enzymatic Hydrolysis of Ammonia-Treated Cassava Leaves (*manihot esculenta crantz*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153(1–3), 94–102. doi: 10.1007/s12010-008-8422-x

Vernaza, M. G., Dia, V. P., Gonzalez, E. y Chang, Y.K. (2012). Antioxidant and Antiinflammatory Properties of Germinated and Hydrolysed Brazilian Soybean Flours. *Food Chemistry*, 134(4), 2217–25. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.04.037

Vollet, G., Janser, R., de Castro, S., Teixeira, M., Zandonadi, S., Dias, H., Queiroz, D., Roberto, M., Júnior, M., Sussulini, A. y Dupas, M. (2020). Proteolytic Enzymes Positively Modulated the Physicochemical and Antioxidant Properties of Spent Yeast Protein Hydrolysates. *Process Biochemistry*, 91, 34–45. doi: 10.1016/j.procbio.2019.11.030

Wang, G., Zhong, B., Yang, Z. y Zhao, Y. (2015). Method for Extracting Protein from *Moringa Oleifera* Leaf, Beverage Containing Protein Extracted Thereby and Method for Preparing Beverage. WO2018038376A, Korea.

Wang, J., Liao, W., Nimalaratne, C., Chakrabarti, S. y Wu, J. (2018). Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Cooked Eggs Using a Dynamic in Vitro Gastrointestinal Model in Vascular Smooth Muscle A7r5 Cells. *Npj Science of Food*, 2(1), 1–7. doi: 10.1038/s41538-018-0015-7

Wang, L., Ding, L., Xue, C., Ma, S., Du, Z., Zhang, T. y Liu, J. (2018). Corn Gluten Hydrolysate Regulates the Expressions of Antioxidant Defense and ROS Metabolism Relevant Genes in H₂O₂-Induced HepG2 Cells. *Journal of Functional Foods*, 42, 362–70. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.056

Wang, X., Bhullar, K. S., Fan, H., Liao, W., Qiao, Y., Su, D. y Wu, J. (2020). Regulatory Effects of a Pea-Derived Peptide Leu-Arg-Trp (LRW) on Dysfunction of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells against Angiotensin II Stimulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), 3947–53. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00028

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. y Ma, H. (2020). Plant Protein-Derived Antioxidant Peptides: Isolation, Identification, Mechanism of Action and Application in Food Systems: A Review. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 308–22. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.019

Williams, N. J., Gan, W., Reibenspies, J. H. y Hancock, R. D. (2009). Possible Steric Control of the Relative Strength of Chelation Enhanced Fluorescence for Zinc (II) Compared to Cadmium (II): Metal Ion Complexing Properties of Tris (2-Quinolylmethyl) Amine , a Crystallographic , UV - Visible , and Fluorometric Study. *Inorg Chem.*, 48(4), 1407–15. doi: 10.1021/ic801403s

Wolfe, K. L. y Rui, H. L. (2007). Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907. doi: 10.1021/jf0715166

Wong, F. C., Xiao, J., Wang, S., Yaw, K. y Thai, T. (2020). Advances on the Antioxidant Peptides from Edible Plant Sources. *Trends in Food Science and Technology*, 99, 44–57. doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.012

Wouters, A. G. B., Schaefer, S., Joye, I. J. y Delcour, J. A. (2019). Relating the Structural, Air-Water Interfacial and Foaming Properties of Wheat (*triticum aestivum l.*) Gliadin and Maize (*zea mays l.*) Zein Based Nanoparticle Suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 567, 249–59. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.01.071

Wu, Q., Du, J., Jia, J. y Kuang, C. (2016). Production of ACE Inhibitory Peptides from Sweet Sorghum Grain Protein Using Alcalase: Hydrolysis Kinetic, Purification and Molecular Docking Study. *Food Chemistry*, 199, 140–49. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.012

Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H. y Zhao, X. (2017). Identification of Iron-Chelating Peptides from Pacific Cod Skin Gelatin and the Possible Binding Mode. *Journal of Functional Foods*, 35, 418–27. doi: 10.1016/j.jff.2017.06.013

Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M. y Chen, L. (2012). Fractionation and Characterization of Antioxidant Peptides Derived from Barley Glutelin by Enzymatic Hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509–18. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.063

- Xu, D., Yu, C., Wang, J., Fan, Q., Wang, Z., Xiao, W., Duan, J., Zhou, J. y Ma, H. (2021). Ultrafiltration Strategy Combined with NanoLC-MS/MS Based Proteomics for Monitoring Potential Residual Proteins in TCMIs. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1178, 122818. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122818
- Xu, Y., Li, Y., Bao, T., Zheng, X., Chen, W. y Wang, J. (2017). A Recyclable Protein Resource Derived from Cauliflower By-Products: Potential Biological Activities of Protein Hydrolysates. *Food Chemistry*, 221, 114–22. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.053
- Xu, Y., Huang, X. y Sun, T. (2015). Study on Optimization of Hydrolysis Condition on Alfalfa Leaf Protein by Papain. *Shipin Gongye*, 36(5), 60–62.
- Yang, J., y Sagis, L. M. C. (2021). Interfacial Behavior of Plant Proteins — Novel Sources and Extraction Methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 56, 101499. doi: 10.1016/J.COCIS.2021.101499
- Yust, M., Millán, M., Alcaide, J. M., Millán, F. y Pedroche, J. (2013). Hydrolysis of Chickpea Proteins with Flavourzyme Immobilized on Glyoxyl-Agarose Gels Improves Functional Properties. *Food Science & Technology*, 19(3), 217–23. doi: 10.1177/1082013212442197
- Zhang, C., Sanders, J. P. M. y Bruins, M. E. (2014). Critical Parameters in Cost-Effective Alkaline Extraction for High Protein Yield from Leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67(0), 466–72. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.020.
- Zhang, F., Qu, J., Thakur, K., Guo, J., Mocan, A. y Jun, Z. (2019). Purification and Identification of an Antioxidative Peptide from Peony (*paeonia suffruticosa andr.*) Seed Dreg. *Food Chemistry*, 285, 266–74. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.01.168
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X. y Yao, H. (2010). Isolation and Identification of Antioxidative Peptides from Rice Endosperm Protein Enzymatic Hydrolysate by Consecutive Chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry*, 119(1), 226–34. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.06.015

- Zhang, M., Mu, T.H. y Sun, M. J. (2014). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Sweet Potato Protein Hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 191–200. doi: 10.1016/J.JFF.2014.02.012
- Zhang, Q., Zhang, J., Zhu, M., Zheng, J., Li, H. y Su, Y. (2015). Preparation of Peptide and Polypeptide from Leaf of Pumpkin. *Nutrition Sciences*, 70(4). doi: 10.31883/pjfns/130401
- Zhang, W., Huang L., Chen, W., Wang, J. y Wang, S. (2021). Influence of Ultrasound-Assisted Ionic Liquid Pretreatments on the Functional Properties of Soy Protein Hydrolysates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105546. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2021.105546
- Zhao, T., Huang, L., Luo, D., Xie, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Jiao, W., Su, G. y Zhao, M. (2021). Fabrication and Characterization of Anchovy Protein Hydrolysates-Polyphenol Conjugates with Stabilizing Effects on Fish Oil Emulsion. *Food Chemistry*, 351, 129324. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129324
- Zhou, H., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Chen, H. y Cao, F. (2016). Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing on the Hydrolysis and Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 9(5), 839–48. doi: 10.1007/s11947-016-1676-3