

## Actividad biológica de hidrolizados de hoja de yuca variedad venezolana obtenidos con diferentes enzimas microbianas

Lina M. Suarez<sup>1</sup>, Jairo G. Salcedo<sup>2</sup> y José E. Zapata<sup>1\*</sup>

(1) Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.  
(correo-e: [linam.suarez@udea.edu.co](mailto:linam.suarez@udea.edu.co); [edgar.zapata@udea.edu.co](mailto:edgar.zapata@udea.edu.co))

(2) Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. (correo-e: [jairo.salcedo@unisucre.edu.co](mailto:jairo.salcedo@unisucre.edu.co))

\* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

Recibido Jul. 15, 2021; Aceptado Sep. 15, 2021; Versión final Nov. 15, 2021, Publicado Abr. 2022

### Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antioxidante, quelante de metales y anticoagulante de hidrolizados preparados con hoja de yuca variedad venezolana. Se realizó hidrólisis enzimática con cuatro proteasas (Alcalasa 2.4 L<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup>). La actividad antioxidante fue medida por métodos basados en transferencia de átomos de hidrógeno y en transferencia de electrones. Se evaluó la actividad quelante de metales y se midió la actividad anticoagulante mediante tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). Los resultados mostraron que la actividad antioxidante fue mayor para Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> por la mayoría de los métodos. La actividad quelante de hierro fue mayor para Flavourzyme<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup> y la quelante de calcio no superó el 6.6%. La actividad anticoagulante medida por TTPA fue mayor para Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>. Se concluye que mediante hidrólisis enzimática preparada con hoja de yuca es posible obtener hidrolizados con actividad biológica usando enzimas de origen microbiano.

*Palabras clave:* actividad antioxidante; hidrólisis enzimática; alcalasa; flavourzyme; neutrasa; protamex

## Biological activity of Venezuelan variety cassava leaf hydrolyzates obtained by using different microbial enzymes

### Abstract

The objective of this study was to evaluate antioxidant, metal chelating, and anticoagulant activity of hydrolysates prepared with Venezuelan variety cassava leaf. Enzymatic hydrolysis was performed with four proteases (Alcalase 2.4 L<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Neutrase 0.8L<sup>®</sup>, and Protamex<sup>®</sup>). Antioxidant activity was measured by hydrogen atom transfer-based methods and electron transfer-based methods. Metal chelating activity was assessed and anticoagulant activity was measured by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT). The results showed that antioxidant activity was highest for Alcalase 2.4L<sup>®</sup> by most methods. Iron chelating activity was highest for Flavourzyme<sup>®</sup> and Protamex<sup>®</sup>. The calcium chelator did not exceed 6.6%. The anticoagulant activity measured by APTT was highest for Alcalase 2.4L<sup>®</sup>. It is concluded that hydrolysates having biological activity can be obtained successfully by enzymatic hydrolysis of cassava leaf by using enzymes of microbial origin.

*Keywords:* antioxidant activity; enzymatic hydrolysis; alcalasa; flavourzyme; neutrasa; protamex

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los recursos vegetales han atraído la atención como una fuente alternativa de compuestos bioactivos debido al bajo costo y buena calidad nutricional que poseen (Esfandi et al., 2019). La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) es una importante fuente de alimento para muchos países, ha ido ganando cada vez más importancia en los últimos años, en términos de producción y uso en alimentación humana (Benítez et al., 2008). A partir de la planta de yuca se obtiene principalmente dos productos las raíces (50%) y las hojas (10%). Durante el cultivo, la producción de hojas puede alcanzar aproximadamente dos t de materia seca por ha y se estima que a nivel mundial se producen aproximadamente 49 millones de t de hoja al año, considerados como desechos agroindustriales o subproductos.

La hoja de yuca es considerada uno de los recursos vegetales con mayor contenido de proteína con alta calidad biológica, ya que sus aminoácidos esenciales son similares a los del huevo de gallina (Da Silva et al., 2012), las hojas de espinaca (Jin et al., 2016), el grano de avena y el arroz (Ortiz-Martinez et al., 2014). La hoja de yuca como fuente proteica ha mostrado alto grado de digestibilidad en dietas para consumo humano (Giraldo et al., 2008), aporta buenas características bioquímicas a los huevos de aves alimentadas con dietas a base de hojas de yuca (Achidi et al., 2008) y se ha usado en dietas para cerdos (Castellanos et al., 1994). Por su alto contenido de proteína y bajo costo por ser considerado un subproducto la hoja de yuca puede ser considerada como una buena fuente de péptidos bioactivos.

Los péptidos biológicamente activos se definen como fragmentos de proteínas que permanecen inactivos en la secuencia de sus precursores, tienen un tamaño de 2 a 20 aminoácidos y masas moleculares de menos de 6000 Da (Tkaczewska, 2020). Estos fragmentos una vez liberada pueden interactuar con ciertos receptores y regular funciones fisiológicas del organismo, con lo que pueden expresar algún tipo de efecto sobre el comportamiento metabólico favoreciendo ciertas condiciones de salud (Tkaczewska 2020). Los péptidos bioactivos son obtenidos por tratamiento con ácidos, enzimas y fermentación (Urbizo-Reyes et al., 2019). La hidrólisis enzimática produce cambios moleculares en las proteínas, que se ven reflejados en el mejoramiento de las propiedades funcionales y biológicas, con respecto a la proteína nativa (Urbizo-Reyes et al., 2019), además, usa condiciones moderadas que no causan daños a los aminoácidos (Giraldo et al., 2008).

Los hidrolizados de proteínas han sido ampliamente estudiados, por ser considerados seguros, saludables, de bajo costo y potencialmente bioactivos. Es así como diversos vegetales se han usado para producir hidrolizados con actividad biológica, entre las que se encuentra la actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas de gluten de maíz (Jin et al., 2016), arroz y garbanzo (Zhang et al., 2010), cebada y linaza (Kulczyk et al., 2016). También se han obtenido péptidos con actividades asociadas a la antioxidante, como son la antihipertensiva de granos de trigo (Wu et al., 2016) y quelante de metales en hidrolizados de proteína de salvado de avena (Esfandi et al., 2019).

Se han usado diferentes proteasas para la hidrólisis de proteínas de fuentes vegetales, entre las que se cuenta Alcalasa® (Wu et al., 2016), Flavourzyme® (Kulczyk et al., 2016), Neutrasa® (Zhang et al., 2010), Protamex® (Zhou et al., 2016) y la combinación secuencial de ellas (Jin et al., 2016). 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. Flavourzyme® es una mezcla de enzimas con actividades endo y exopeptidasa, que tiene una amplia especificidad para producir péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres. Mientras endopeptidasas como la Alcalasa® y la Neutrasa® 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 endopeptidasa usada para la extracción de proteínas animales (Zhou et al., 2016). Sin embargo, son escasos los estudios que han evaluado la actividad biológica de extractos ricos en proteínas provenientes de material vegetal como las hojas, es por esto que el objetivo del presente estudio fue evaluar actividad antioxidante, quelante de metales y anticoagulante de hidrolizados preparados con hoja de yuca variedad Venezolana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La materia prima fue la hoja de yuca, las cuales fueron obtenidas de cultivos de yuca de la variedad Venezolana mayor a 6 meses de cultivo 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, es una 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.

### Pretratamiento de la hoja de yuca

Las hojas de yuca fueron separadas del tallo, descartando las que estaban deterioradas. Luego, se sometieron al tratamiento reportado por Bradbury y Denton (2014), con algunas modificaciones. Inicialmente fueron molidas en un procesador de alimentos (Oster, Colombia), luego 100 g de hojas molidas fueron mezcladas con 1000 mL de agua destilada a 90°C en agitación durante 5 min, proceso que se repitió 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.

### Composición proximal

La caracterización fisicoquímica de la harina de hoja de yuca fue realizada 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, %) fue calculado como se indica en la ecuación 1 (Braspaiboon et al., 2020):

$$E = \frac{\text{g de proteínas soluble en el extracto acuoso}}{\text{g de proteína inicial en la harina de hojas de yuca}} \times 100\% \quad (1)$$

### Actividad enzimática

La actividad catalítica de la Alcalasa 2.4 L<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup> fue determinada mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por Cheung et al. (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 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, luego 200 µL del sobrenadante fueron tomados y mezclados con 500 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 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 2 y 3. La actividad enzimática se expresa en unidades/g de proteína.

$$\frac{\text{unidades}}{\text{mL enzima}} = \frac{\mu\text{moles de equivalentes de tirosina liberados} \times V_T}{V_C \times t \times V_E} \quad (2)$$

$$\frac{\text{unidades}}{\text{g de proteína}} = \frac{\frac{\text{unidades}}{\text{mL enzima}}}{\frac{\text{g proteína}}{\text{mL enzima}}} \quad (3)$$

Donde V<sub>T</sub> es el volumen total del ensayo (mL); V<sub>C</sub> es el volumen usado en la determinación colorimétrica (mL); t es el tiempo de reacción de las enzimas (min); V<sub>E</sub> es el volumen de enzima usado para el ensayo (mL).

### Hidrolisis enzimática

La hidrólisis enzimática fue realizada en un reactor de vidrio con chaqueta de recirculación de agua con control de temperatura y agitación. Una dispersión acuosa de harina de hoja de yuca, con 4 g de proteína/L, fue equilibrada a la temperatura y pH de trabajo como se muestra en la Tabla 1 durante 40 min. El pH fue ajustado con hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 M.

Tabla 1: Condiciones de hidrólisis: enzima, temperatura y pH.

Enzima	Temperatura (°C)	pH
Alcalasa 2.4L <sup>®</sup>	50	9.0
Neutrasa 0.8L <sup>®</sup>	50	7.0
Protamex <sup>®</sup>	50	8.0
Flavourzyme <sup>®</sup>	50	8.0

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. 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). 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 a 6800g 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.

El grado de hidrólisis (GH, %) fue calculado a partir de la cantidad de la base consumida por ensayo pH-stat, siguiendo la Ecuación 4, 5 y 6 (Adler-Nissen, 1986).

$$GH = \frac{h}{h_{TOT}} \times 100\% = B \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{Mp} \times \frac{1}{h_{TOT}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1+10^{pH-pK})} \quad (5)$$

$$pK = 7.8 + \frac{(298-T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (6)$$

Donde B es el consumo de base en mL; Nb es la normalidad de la base;  $\alpha$  es el grado medio de disociación de los grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>; Mp es la masa de la proteína (N  $\times$  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).

#### Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las muestras la harina de hoja de yuca fue determinada después de la hidrólisis ácida 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  $\mu$ m. 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  $\mu$ m (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).

$h_{TOT}$  es el 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 generalmente fueron dadas como g por 100 g de proteína (16 g N usando el factor estándar 6.25) (Adler-Nissen, 1986). Es posible calcular  $h_{TOT}$  de la concentración de cada aminoácido usando las ecuaciones 7 y 8.

$$h_{TOT} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{18} Fi} * (1+Fi) * 1000 \quad (7)$$

$$Fi = \frac{[Ai]}{\sum_{i=1}^{18} [Ai]} * (PM)_i \quad (8)$$

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.

#### Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (CARO)

50  $\mu$ L de hidrolizado o 75  $\mu$ L de buffer fosfato de sodio 0.075 M pH7 como control fueron mezclados con 50  $\mu$ L de fluoresceína (78 nM) en una placa negra de 96 pozos, seguido de incubación a 37 °C durante 15 min y 25  $\mu$ L de Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH) 221 mM fueron agregado a la mezcla de reacción. La fluorescencia fue medida cada minuto durante 120 minutos con un lector de placas Varioskan, (Thermofisher, EE. UU.), Excitación: 485 nm y Emisión: 535 nm.

### Capacidad antioxidante equivalente Trolox (CAET)

Fue determinado de acuerdo a Esteve et al. (2015) con algunas modificaciones, la solución madre de ABTS<sup>o+</sup> 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 ABTS<sup>o+</sup> fresca fue preparada mezclando la solución madre de ABTS<sup>o+</sup> 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  $\mu$ L de hidrolizado o buffer fosfato para el control con 180  $\mu$ L de solución fresca de ABTS<sup>o+</sup>, 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  $\mu$ mol equivalente trolox/g hidrolizado seco ( $\mu$ mol ET/g).

### Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)

La solución FRAP fue preparada en una proporción 1:1:10 de tripiridiltriazina (TPTZ) 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  $\mu$ L de hidrolizado o buffer acetato como control más 175  $\mu$ L de solución FRAP fresca. Luego, fue incubada durante 30 min a 37 °C, la absorbancia fue medida a 595 nm con un lector de placas 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 como  $\mu$ mol ET/g.

### Actividad blanqueamiento de crocin (ABC)

Fue realizado siguiendo el método descrito por Gómez et al. (2019) con algunas modificaciones. Las soluciones de crocin 100  $\mu$ M y 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) 18.5mM fueron preparadas justo antes de usar, en buffer fosfato salino (0.01 M-0.12 M NaCl, pH 7.4). 400  $\mu$ L de la solución de crocin fueron mezclados con 200  $\mu$ L de buffer o hidrolizado (1 mg/mL). La reacción fue iniciada con la adición de 400  $\mu$ L de la solución AAPH (precalentada por 5 min a 37°C). La mezcla fue agitada 30 s y la absorbancia del tiempo cero fue medida a 442 nm. La mezcla fue incubada durante 20 min y la absorbancia fue nuevamente medida a 442 nm espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (ThermoFisher, EE. UU.). El cálculo del porcentaje de inhibición del valor de blanqueo de crocin (%Inh), fue realizado según la ecn. (9).

$$\%Inh = [(\Delta A_b - \Delta A) / \Delta A_b] \times 100 \quad (9)$$

En esta ecuación,  $\Delta A_b$  y  $\Delta A$  es el cambio en la absorbancia del tiempo 0 a los 20 min, en ausencia y presencia de la muestra, respectivamente.

### Ensayo de capacidad de quelación del Fe<sup>2+</sup>

La actividad quelante de Fe<sup>2+</sup> fue medida según Zhang et al. (2014). La mezcla de reacción contenía 1000  $\mu$ L de solución de hidrolizado (0.5 g/ml), 40  $\mu$ L de ferrozina al 97%, 20  $\mu$ L de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) 2 mM. La mezcla fue agitada vigorosamente por 10 segundos, debe ser incubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. La absorbancia fue leída a 565 nm espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (ThermoFisher, EE. UU.). La capacidad de quelante de Fe<sup>2+</sup> fue calculada utilizando la ecuación 10.

$$\% \text{ quelante de hierro} = \left( \frac{\text{abs blanco} - \text{abs muestra}}{\text{abs blanco}} \right) * 100\% \quad (10)$$

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.

### 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 (CaCl<sub>2</sub>) 5mM. La solución fue agitada a 200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugada a 10000g por 10 min 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-cresoltaleína leyendo la absorbancia a 570 nm espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (ThermoFisher, EE. UU.) (Zhao et al., 2014).

### 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 a 2800 por 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, EE.UU.) y kits de diagnóstico, siguiendo la metodología descrita por Ktari et al.(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 (TP) fueron adicionados 70  $\mu$ L de PPP y 30  $\mu$ L de muestra fueron incubados a 37°C por 3 min. Luego, 200  $\mu$ L del reactivo TP fueron adicionados y el tiempo de formación del coagulo fue registrado. El Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) 70  $\mu$ L de PPP con 30  $\mu$ L de la muestra fueron encubados a 37°C por 2 min y 100  $\mu$ L del reactivo TTPA fueron mezclados e incubado 5 min. El tiempo de coagulación fue registrado inmediatamente después de la adición de 100  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 25 mM.

### ANALISIS Y RESULTADOS

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis bromatológico de la harina de hoja de yuca variedad Venezolana.

#### Caracterización de hojas de yuca

En la Tabla 2 se observa que la harina de hoja de yuca tiene una humedad por debajo del 11% lo que ayuda a que no haya un crecimiento microbiano acelerado. El contenido de cenizas y extracto etéreo estuvo por debajo de los valores encontrados por Achidi et al.(2008) y 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.(1994) de 17.7%.Mientras que los carbohidratos representan la mayor parte de su composición debido a la parte fibrosa.

Tabla 2: Caracterización fisicoquímica de harina de hojas de yuca variedad Venezolana.

Composición fisicoquímica	
Humedad (%)	6.47±0.13
Cenizas (%)	4.87±0.19
Extracto etéreo (%)	5.12±0.08
Proteína (%)	26.73±0.26
Carbohidratos (%)	56,81

En la Tabla 3 se muestra el contenido de aminoácidos de la harina de hojas de yuca donde se evidencia que los aminoácidos en mayor proporción fueron Tyr, Cit, Glu, Asp, Lys y Ile. Mientras que His, Met, y Lys presentaron valores similares a los reportados por Urribarrí et al.(2009) 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<sup>®</sup> que prefiere el lado carboxi de los residuos hidrofóbicos (Wu et al., 2016). Por ejemplo, para CARO se ha reportado que la exposición durante la hidrólisis de residuos como Gly, Ala, Ile, Trp, Tyr y Met, puede aumentar las interacciones hidrofóbicas de los péptidos con agentes oxidantes (Urbizo-Reyes et al., 2019).

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, debida 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  $h_{TOT}$  encontrado presenta valores cercanos a otros materiales vegetales como la soya negra de 7.8 meqv/g de proteína (Li et al., 2018).

#### Hidrólisis de hojas de yuca variedad Venezolana

Antes de iniciar los tratamientos de hidrólisis enzimática, la actividad proteolítica de las enzimas Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>; Neutrasa 0.8L<sup>®</sup>; Flavourzyme<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup> 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 fue de 4.59, 6.67, 0.80 y 6.13 unidades/g de proteína para Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>; Neutrasa 0.8L<sup>®</sup>; Flavourzyme<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup>, respectivamente

Tabla 3: Contenido de aminoácidos de la hoja de yuca variedad Venezolana comparado con la hoja de yuca variedad Tempranita.

Aminoácidos	HY Concentración (g/100 g proteína)	Hoja de yuca
		(Urribarrí et al., 2009)
Histidina (His)	3.1	2.6
Treonina (Tre)	1.7	4.9
Tirosina (Tyr)	22.7	3.9
Fenilalanina (Phe)	1.6	---
Valina (Val)	3.8	5.6
Arginina (Arg)	1.2	5.7
Metionina (Met)	2.5	1.7
Isoleucina (Iso)	6.4	4.8
Leucina (Leu)	4.4	8.8
Lisina (Lis)	6.1	6.3
Ácido Aspártico (Asp)	7.9	10.9
Serina (Ser)	1.8	3.9
Ácido Glutámico (Glu)	8.8	12.1
Asparagina (Asn)	1.6	---
Glicina (Gly)	1.5	4.7
Alanina (Ala)	4.4	6.3
Cisteína (Cys)	1.7	1
Citrulina (Cit)	10.7	---
AAT	91.8	---
AAE	53.4	---
AAH	24.6	---
AAA	52.6	---

En la figura 1 se observa las curvas del seguimiento del GH obtenido para las diferentes enzimas, donde se observa que la Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> tuvieron un comportamiento similar hasta los 8000 s, donde esta última tuvo un aumento de la velocidad de reacción después de este tiempo. Por su parte, la Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> estuvo por debajo de las otras enzimas, durante todo el periodo de evaluación.

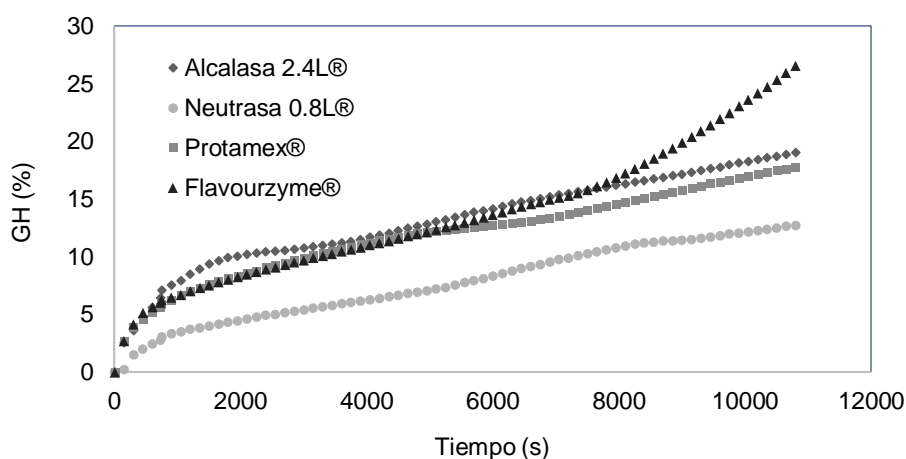


Fig. 1: Curva del comportamiento del grado de hidrólisis en función del tiempo de la hidrólisis de hoja de yuca usando Alcalasa 2.4L<sup>®</sup>, Neutrasa 0.8L<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup>.

En la Tabla 4, se observa que el grado de hidrólisis (GH) difirió significativamente para Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>, mientras Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> y Protamex<sup>®</sup> no presentaron diferencias significativas. La Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> mostró un GH inferior a la Flavourzyme<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> y Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> debido a que al ser una endoproteasa, la Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> 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. (2020) donde realizaron hidrólisis de gelatina de pescado. El GH del 19.03% para la Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> se atribuye al hecho de que la Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> es más inespecífica que las otras enzimas en estudio (Gómez et al., 2019). Se

informaron resultados similares para los hidrolizados de linaza y cebada, donde la Flavourzyme® logró un GH mayor en comparación con la Alcalasa 2.4L® (Kulczyk et al., 2016), esto se explica dado 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 endo-proteasa que corta enlaces peptídicos en el interior de las cadenas polipeptídicas, por lo tanto, produce principalmente péptidos de tamaño pequeño y mediano, mientras la Neutrassa® es una metaloendopeptidasa que preferentemente corta los enlaces cerca del terminal carboxilo entre los aminoácidos hidrófobos, incluidos Leu y Tyr (Zhou et al., 2016).

Los resultados de E obtenido se muestran en la Tabla 4, donde se observa mayor rendimiento de proteína extraída para la hidrólisis enzimática realizadas con Alcalasa 2.4L®, seguida de Flavourzyme®, Protamex® y Neutrassa 0.8L®. 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, ya que el NaOH usado para mantener el pH en 9 puede extraer proteínas de la materia prima al descomponer las interacciones entre proteínas, como los enlaces covalentes (enlaces disulfuro intermoleculares) o no covalentes (hidrógeno e hidrófobos) (Braspai boon 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 et al., 2015). En la Tabla 4 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 ( $p < 0,05$ ).

Tabla 4: Propiedades de los hidrolizados de hoja de yuca preparados usando Alcalasa 2.4L®, Neutrassa 0.8L®, Flavourzyme® y Protamex®.

Enzima	GH (%)	E (%)	CAET ( $\mu\text{mol}$ trolox/g)	FRAP ( $\mu\text{mol}$ trolox/g)	CARO ( $\mu\text{mol}$ trolox/g)	ABC (% Inh)
Alcalasa 2.4L®	19.03 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	38.28 $\pm$ 2.85 <sup>a</sup>	622.45 $\pm$ 73.61 <sup>c</sup>	504.47 $\pm$ 17.41 <sup>b</sup>	641.32 $\pm$ 18.44 <sup>b</sup>	85.69 $\pm$ 4.86 <sup>a</sup>
Neutrassa 0.8L®	12.75 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	26.19 $\pm$ 2.85 <sup>b</sup>	513.04 $\pm$ 48.71 <sup>b</sup>	440.90 $\pm$ 7.32 <sup>c</sup>	273.42 $\pm$ 3.83 <sup>a</sup>	85.51 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
Flavourzyme®	26.58 $\pm$ 3.03 <sup>c</sup>	34.25 $\pm$ 2.85 <sup>c</sup>	373.62 $\pm$ 21.79 <sup>a</sup>	299.86 $\pm$ 17.41 <sup>a</sup>	550.42 $\pm$ 32.67 <sup>c</sup>	80.62 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>
Protamex®	17.81 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	30.22 $\pm$ 2.85 <sup>c</sup>	425.27 $\pm$ 13.33 <sup>a</sup>	339.93 $\pm$ 34.17 <sup>a</sup>	275.62 $\pm$ 26.06 <sup>a</sup>	87.08 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>

Sin embargo, se requerirían más estudios detallados centrados en el control del proceso para cuantificar con precisión la magnitud de estas reducciones. Además, 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).

#### Evaluación de actividades biológicas

En la Tabla 4 se muestra los resultados de la actividad antioxidante de los hidrolizados de hojas de yuca tratados medidas con los métodos CAET, FRAP, CARO y ABC, para las cuatro enzimas en estudio. La actividad antioxidante medida por el método de CAET, FRAP y CARO fue mayor para la Alcalasa 2.4L®. Mientras, CAET y FRAP para Flavourzyme® y Protamex® no presentaron diferencias significativas. Por su lado, Neutrassa 0.8L® y Protamex® no presentaron diferencias significativas para la actividad antioxidante medida por el método de CARO.

#### Actividad Antioxidante

En el presente estudio se ha encontrado valores de CAET mayores que los encontrado para las enzimas Alcalasa, Neutrassa y Flavourzyme en hidrolizado de semilla de girasol valores de 363, 272 y 222  $\mu\text{mol}$  trolox/g, respectivamente (Esteve et al., 2015). En otro estudios con Alcalasa 2.4 L®, se reportaron valores inferiores para CAET para los hidrolizados de semilla de palma datilera con una actividad de 460  $\mu\text{mol}$  ET trolox /g (Ambigaipalan et al., 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).

#### Actividad quelante de metales

Esta actividad tiene relación con la actividad antioxidante debido a que en numerosos 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 alcóxido 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 et al., 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). En la Tabla 5 se observa que los resultados de la actividad quelante de hierro fue mayor para Flavourzyme® y Protamex®, seguida de la Alcalasa 2.4L® y Neutrasa 0.8L®, respectivamente. La actividad quelante de calcio no superó el 20% a la concentración de péptidos evaluada, 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 hoja de yuca variedad Venezolana (Tkaczewska et al., 2020). Mientras que 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 como en este caso (Di Bernardini et al., 2011). En la Tabla 5 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 ( $p < 0,05$ ).

Tabla 5: Comparación de la actividad quelante de metales y anticoagulante de los hidrolizados de hoja de yuca preparados usando Alcalasa 2.4L®, Neutrasa 0.8L®, Flavourzyme® y Protamex®.

Enzima	Quelante de hierro (% 0.5mg/ml)	Quelante de calcio (%, 2 mg/ml)	TTPA (1.0 mg/ml)	TP (1.0 mg/ml)
			Tiempo (s)	Tiempo (s)
Alcalasa 2.4L®	38.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 1.38 <sup>a,b</sup>	55.05 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	10.60 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
Neutrasa 0.8L®	30.2 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	34.00 $\pm$ 5.51 <sup>b</sup>	10.95 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>
Flavourzyme®	48.0 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	4.2 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup>	40.00 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>	11.90 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
Protamex®	48.5 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>	2.4 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	40.90 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	12.35 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>

La propiedad antioxidante de los quelantes de metales se presenta 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) 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<sup>2+</sup> es un ion de metal de transición clave que podría causar la destrucción de biomoléculas y en consecuencia, provocar el inicio de enfermedades en los seres humanos. Por lo tanto, la quelación de iones de metales de transición por un antioxidante evitaría la oxidación (Ambigaipalan et al., 2015). La capacidad de quelación de metales también se utiliza como indicador de la actividad antioxidante, normalmente en combinación con otros ensayos antioxidantes (Shahidi y Zhong, 2015).

#### Actividad Anticoagulante

TTPA y TP son los análisis de sangre comunes para evaluar el riesgo de hemorragia y trombosis. La Tabla 5 muestra la actividad anticoagulante de los hidrolizados de hoja de yuca medida con las pruebas TTPA y TP. TTPA fue mayor para el hidrolizado obtenido con la enzima Alcalasa 2.4L® seguida de Flavourzyme®, Protamex® y Neutrasa®, las cuales no presentaron diferencias significativas. Por su lado, TP no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. El hidrolizado de hoja de yuca preparado con Alcalasa 2.4L® tuvo 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 uno del otro, ya que todos los factores de coagulación se interrelacionan entre sí. Datos de TTPA entre 35 y 83, para TP entre 13 y 18 fueron encontrados para fracciones de hidrolizados de proteínas de cebrá 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).

## CONCLUSIONES

De los resultados mostrados, de su análisis y de su discusión, se pueden obtener las siguientes conclusiones, sobre la obtención de hidrolizados con proteasas de origen microbiano preparado con hoja de yuca variedad Venezolana: (1) Es posible obtener hidrolizados preparados con hojas de yuca que presenten actividad antioxidante, quelante de hierro y anticoagulante, usando Alcalasa 2.4 L<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>, Neutrasa 0.8L<sup>®</sup> y protamex<sup>®</sup>; y (2) Entre las enzimas evaluadas, la Alcalasa 2.4L<sup>®</sup> demostró producir hidrolizados con mayor eficiencia de recuperación de proteína, mayor actividad antioxidante y actividad anticoagulante.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen a la Universidad de Antioquia por poner sus instalaciones a disposición del proyecto, así mismo a COLCIENCIAS por el apoyo económico brindado a través del crédito-beca de la convocatoria 727.

## NOTACIÓN

### *Símbolos*

E= Rendimiento de proteína extraída

$F_i$  = Fracción molar del aminoácido  $i$

GH = Grado de hidrólisis

$h_{TOT}$  = Número de enlaces peptídicos por gramo de proteína

Inh = Inhibición del valor de blanqueo de crocin

$(PM)_i$  = Peso molecular de cada aminoácido  $i$

$[A_i]$  = concentración molar del aminoácido  $i$  ( $\mu\text{mol/mL}$ ),

### *Abreviaciones*

AAA= aminoácidos antioxidantes

AAE= aminoácidos esenciales

AAH= aminoácidos hidrofóbicos

AAT= aminoácidos totales

AOAC= Association of Official Analytical Chemists

CARO= Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

CAET = Capacidad antioxidante equivalente Trolox

FRAP= Poder antioxidante reductor de iones férricos

ABC= Actividad blanqueamiento de crocin

TP= Tiempo de protrombina

TTPA= Tiempo de tromboplastina parcial activada

OPA= o-ftalaldehído

FMOC= 9-fluorenilmetoxicarbonilo

HPLC= High Performance Liquid Chromatography

PPP= plasma pobre en plaquetas

HY= Hoja de yuca

## REFERENCIAS

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Ed., AOAC Gaithersburg, USA (2012)

Achidi, A.U., Ajayi, O.A., Maziya-Dixon, B., y Bokanga, M., The effect of processing on the nutrient content of cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) leaves, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00165.x>, J. Food Process Preserv., 32 (3), 486–502 (2008)

Adler-Nissen, J., Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier Applied Science Publishers (1986)

Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A.S., y Shahidi, F., Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using alcalase, flavourzyme and thermolysin, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>, J. Funct. Foods., 18 (B), 1125-1137 (2015)

Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J., Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones, Acta Bioquim. Clin. Latinoam., ISSN: 0325-2957, 42(2), 227–236 (2008)

- Bradbury, J.H., y Denton, I.C., Mild method for removal of cyanogens from cassava leaves with retention of vitamins and protein, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.132>, *Food Chem.*, 158, 417–420 (2014)
- Braspaiboon, S., Osiriphun, S., Peepathum, P., y Jirattanarangsri, W., Comparison of the effectiveness of alkaline and enzymatic extraction and the solubility of proteins extracted from carbohydrate-digested rice, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05403>, *Heliyon*, 6(11), 1-8 (2020)
- Castellanos, R., Altamirano, S., y Moretti, R., Nutritional characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf protein concentrates obtained by ultrafiltration and acidic thermocoagulation, <http://doi.org/10.1007/BF01088085>, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 45, 357–363 (1994)
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y., y Li-Chan, E.C.Y., The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.215>, *Food Chem.*, 134(3), 1297–1306 (2012)
- Da Silva, J.L., Gomes, S.D., y otros 7 autores, Protein concentrate obtainment from leaves and aerial part cassava (*Manihot esculenta* crantz), <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6p2279>, *Semina Cienc. Agrar.*, 33(6), 2279–2287 (2012)
- de Castro, R.J.S., Cason, V.G., y Sato, H.H., Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.003>, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 10, 291–297 (2017)
- Di Bernardini, R., Rai, D.K., y otros 4 autores, Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.024>, *Peptides*, 32(2), 388 – 400 (2011)
- Esfandi, R., Willmore, W.G., y Tsopmo, A., Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their in vitro antioxidant and metal chelating properties, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.110>, *Food Chem.*, 279, 49–57 (2019)
- Esteve, C., Marina, M.L., y García, M.C., Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.090>, *Food Chem.*, 167, 272–280 (2015)
- Giraldo, A., Velasco, R.J., y Villada, H.S., Digestibilidad aparente de una harina proveniente de hojas de yuca (*Manihot esculenta* crantz), <https://doi.org/10.4067/S0718-07642008000100003>, *Inf. Tecnol.*, 19(1), 11–18 (2008)
- Gómez, L.J., Gómez, N.A., y otros 4 autores, In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red Tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates, <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.02.029>, *Food Res. Int.*, 120, 52–61 (2019)
- Ho, T.C., Kiddane, A.T., y otros 5 autores, Green extraction of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) radlk: Chemical profile and anticoagulant activity, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.113>, *Int. J. Biol. Macromol.*, 157, 484–493 (2020)
- Jin, D.X., Liu, X.L., y otros 3 autores, Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.119>, *Food Chem.*, 204, 427–436 (2016)
- Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem, R., y otros 5 autores., Functional properties and biological activities of peptides from zebra blenny protein hydrolysates fractionated using ultrafiltration, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100539>, *Food Biosci.*, 34, 1–10 (2020)
- Kulczyk, A., Karamac, M., y Kosińska-Cagnazzo, A., Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity, <https://doi.org/10.3390/ijms17071027>, *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (7), 421-429 (2016)
- Li, M., Xia, S., Zhang, Y., y Li, X., Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave- assisted enzymatic method and study on its stability, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.045>, *LWT Food Sci. Technol.*, 98, 358–365 (2018)
- Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., y García-Lara, S., Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.044>, *J. Proteomics.*, 111, 165–183 (2014)
- Shahi, Z., Sayyed-alangi, S.Z., y Naja, L., 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, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03365>, *Heliyon*, 6(2), 1-10 (2020)
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., y otros 4 autores, The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616>, *LWT Food Sci. Technol.*, 117, 1-9 (2020)
- Urbizo-Reyes, U., San Martín-González, M.F., y otros 3 autores, Physicochemical characteristics of chia seed (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates produced using ultrasonication followed by microwave-assisted hydrolysis, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105187>, *Food Hydrocoll.*, 97, 1-10 (2019)
- Urribarrí, L., Chacón, D., González, O., y Ferrer, A., Protein extraction and enzymatic hydrolysis of ammonia-treated cassava leaves (*Manihot esculenta* crantz), <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8422-x>, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 153, 94–102 (2009)

Wu, Q., Du, J., Jia, J., y Kuang, C., Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.012>, Food Chem., 199, 140–149 (2016)

Zhang, J., Zhang, H., y otros 4 autores, Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.015>, Food Chem., 119(1), 226–234 (2010)

Zhang, M., Mu, T.H., y Sun, M.J., Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by alcalase, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.012>, J. Funct. Foods., 7(10), 191–200 (2014)

Zhou, H., Wang, C., y otros 4 autores, Effects of enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing on the hydrolysis and allergenicity of proteins from ginkgo seeds, <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1676-3>, Food Bioprocess Technol., 9(5), 839–848 (2016)