

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) HIDROLIZADA CON ALCALASA Y FLAVOURZYMA

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CHIA (*Salvia hispanica* L.) PROTEIN FRACTION HYDROLYZED WITH ALCALASE AND FLAVOURZYME

Sonia C. **López-García**¹, Gerónimo **Arámbula-Villa**², Juan G. **Torruco-Uco**³, Adriana **Contreras-Oliva**¹, Francisco **Hernández-Rosas**¹, Mirna **López-Espíndola**¹, José A. **Herrera-Corredor**^{1*}

¹Innovación Agroalimentaria Sustentable. Campus Córdoba. Colegio de Postgraduados. Km 348. Carretera Federal. 94946. Córdoba-Veracruz, Amatlán de los Reyes, Veracruz. (jandreshc@colpos.mx). ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Querétaro. Libramiento Norponiente No. 2000. Fraccionamiento Real de Juriquilla. 76230. Querétaro, Querétaro. México. ³Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Avenida Dr. Víctor Bravo Ahuja S/N, Colonia 5 de Mayo, 68350. Tuxtepec, Oaxaca.

RESUMEN

La variedad de proteínas de origen vegetal que pueden hidrolizarse para producir proteicos bioactivos es amplia. Pero desde una perspectiva sustentable, una forma factible y económica para producirlos es a partir de subproductos. El objetivo de este estudio fue obtener hidrolizados enzimáticos proteicos del subproducto de extracción de aceite de chía (*Salvia hispanica* L.). El diseño experimental fue completamente al azar en un arreglo factorial con dos factores (enzima y tiempo). La actividad antioxidante se evaluó en una matriz alimentaria. Las reacciones de hidrólisis se realizaron en condiciones controladas de pH, temperatura y tiempo con las enzimas Alcalasa® (ALC) y Flavourzyme® (FLA) separadas y en sistema secuencial. El grado de hidrólisis (GH) se estimó con la determinación de grupos amino libres (OPA). Los compuestos fenólicos se determinaron con la reacción Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se obtuvo con los métodos ABTS y DPPH. El GH dependió del tiempo de reacción y de la naturaleza del preparado enzimático. FLA fue más eficaz en la escisión de los enlaces peptídicos (25.44 %, 30 min) que ALC (19.88 %, 150 min). La actividad antioxidante con la FLA fue menor que con ALC. El aumento del GH (37.16 %) durante la digestión con el sistema secuencial ALC-FLA en 90 min mostró la actividad antioxidante ABTS (12.56 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína) y el barrido de radical DPPH (77.47 %) mayores respecto a los tratamientos enzimáticos individuales. Este resultado probablemente se debió a la producción de péptidos de peso molecular bajo y por el efecto sinérgico de compuestos fenólicos. La incorporación de hidrolizados proteicos de chía incrementaron el potencial antioxidante de la matriz alimentaria, podrían favorecer el

ABSTRACT

The variety of proteins of plant origin that can be hydrolyzed to produce bioactive proteins is ample. However, from a sustainable perspective, a feasible and economic way to produce them is using their byproducts. The objective of this study was to obtain protein enzymatic hydrolysates from a byproduct of chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction. The experimental design was completely randomized in a two-factor factorial arrangement (enzyme and time). The antioxidant activity was evaluated in a food matrix. The hydrolysis reactions were performed under controlled conditions of pH, temperature and time with the enzymes Alcalase® (ALC) and Flavourzyme® (FLA) separately and in a sequential system. The hydrolysis degree (HD) was estimated with the determination of free amino groups (FAG). The phenolic compounds were defined with the Folin-Ciocalteu reaction. The antioxidant activity was obtained with the ABTS and DPPH methods. The HD depended on the reaction time and on the nature of the enzyme preparation. FLA was more effective in the breakage of peptide bonds (25.44 %, 30 min) than ALC (19.88 %, 150 min). The antioxidant activity with FLA was lower than with ALC. The increase in HD (37.16 %) during the digestion with the sequential system ALC-FLA in 90 min showed higher ABTS antioxidant activity (12.56 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein) and higher DPPH radical sweep (77.47 %), compared to the individual enzymatic treatments. This result was probably due to the production of peptides of low molecular weight and from the synergetic effect of phenolic compounds. The incorporation of chia protein hydrolysates increased the antioxidant potential of the food matrix, could favor the development of a functional food, and contribute to the revaluation of the byproducts derived from agroindustry.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2018. Aprobado: octubre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 53: 505-520. 2019.

desarrollo de un alimento funcional y contribuir a la revalorización de subproductos derivados de la agroindustria.

Palabras clave: *Salvia hispanica* L., aprovechamiento de subproductos, hidrólisis enzimática, actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica* L.) es nativa en el Sureste de México, estaba entre los cultivos principales de las antiguas culturas mesoamericanas y se ha cultivado en la región durante miles de años. La semilla de chía es fuente de ácidos grasos esenciales ω -3, de fibra dietética, compuestos fenólicos, proteínas, minerales y vitaminas liposolubles como A, E, D y K (Tosco, 2004; Ixtaina *et al.*, 2010; Capitani *et al.*, 2013; Corona-Jiménez *et al.*, 2016). El remanente (o torta) de la extracción de aceite de las semillas de chía es poco aprovechado y posee actividad antioxidante (Taga *et al.*, 1984).

El cambio de dieta puede ser menos dependiente de los alimentos de origen animal, por lo que la exploración de fuentes alternativas de proteínas representa un gran potencial para la industria agroalimentaria (Day, 2013). Además, una demanda primordial, internacional y nacional, es el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

Los residuos agroindustriales ricos en proteínas, derivados principalmente de semillas o granos, como garbanzo, espinaca y girasol ha conducido a desarrollar procesos de hidrólisis enzimática, (Pedroche *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Megias *et al.*, 2004). Los aislados proteínicos se comercializan en polvo, con contenido alto proteína y aporte calórico bajo. Los aislados proteínicos de soya se comercializan para la producción de botanas, cárnicos, bebidas y productos horneados. Los hidrolizados proteicos se producen de fracciones ricas en proteína, concentrados o aislados proteicos. En el proceso, la fuente de proteína se expone a algún catalizador como calor, ácido o enzima para hidrolizarlas e incrementar su digestibilidad o propiedades bioactivas. Entre las ventajas del uso industrial de hidrolizados proteicos, con valor agregado, está mejorar sus características nutricionales y funcionales, retrasar el deterioro y eliminar ingredientes tóxicos o factores antifisiológicos (Clemente *et al.*, 1999a).

Entre los métodos para obtener hidrolizados proteicos está la hidrólisis enzimática y ácida y

Key words: *Salvia hispanica* L., byproduct use, enzyme hydrolysis, antioxidant activity.

INTRODUCTION

Chia (*Salvia hispanica* L.) is native in southeastern Mexico; it was among the main crops of the ancient Mesoamerican cultures and has been grown in the region for thousands of years. The chia seed is a source of ω -3 essential fatty acids, dietary fiber, phenolic compounds, proteins, minerals and fat-soluble vitamins such as A, E, D and K (Tosco, 2004; Ixtaina *et al.*, 2010; Capitani *et al.*, 2013; Corona-Jiménez *et al.*, 2016). The residue (or cake) from the oil extraction of chia seeds that is scarcely used, has antioxidant activity (Taga *et al.*, 1984).

The change in diet can be less dependent on foods of animal origin, which is why exploring alternative sources of proteins represents great potential for the agri-food industry (Day, 2013). In addition, a primordial international and national demand is the use of agro-industrial residues.

Agro-industrial residues that are rich in proteins, derived mainly from seeds or grains, such as chickpea, spinach and sunflower have led to develop enzymatic hydrolysis processes (Pedroche *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Megias *et al.*, 2004). The protein isolates are marketed in powder, with high protein content and low calorie input. The soy protein isolates are already marketed for the production of snacks, meats, beverages and baked products. The protein hydrolysates are produced from fractions rich in protein, concentrates or protein isolates. In the process, the protein source is exposed to a catalyzer such as heat, acid or enzyme to be hydrolyzed and to increase its digestibility or bioactive properties. Among the advantages of the industrial use of protein hydrolysates, with added value, there are improving their nutritional and functional characteristics, delaying the deterioration, and eliminating toxic ingredients or anti-physiological factors (Clemente *et al.*, 1999a).

Among the methods used to obtain protein hydrolysates there is enzymatic and acid hydrolysis and their combination (Sánchez *et al.*, 2014). Enzymatic hydrolysis takes place at pH and temperature that allow eliminating undesirable compounds (Vioque *et al.*, 2001). Among the

su combinación (Sánchez *et al.*, 2014). La hidrólisis enzimática se desarrolla en pH y temperatura que permiten eliminar compuestos indeseables (Vioque *et al.*, 2001). Entre las proteínas puede haber fragmentos inactivos o con actividad fisiológica baja, denominados péptidos bioactivos, que pueden liberarse por hidrólisis, con efectos beneficiosos en el organismo (Benitez *et al.*, 2008; Mulero *et al.*, 2011). Los péptidos bioactivos en cereales y leguminosas pueden incrementar el valor y la calidad de la proteína (Malaguti *et al.*, 2014). El interés por los hidrolizados y péptidos antioxidantes derivados de alimentos se centra en su uso como suplementos dietéticos antioxidantes o como conservantes alimentarios (Ajibola *et al.*, 2011). Al respecto, las semillas de chía proporcionan beneficios a la salud y son fuente de péptidos biológicamente activos. La hidrólisis enzimática produce péptidos bioactivos de fuentes diversas de proteínas, como las de semillas de chía. Los hidrolizados de chía con actividad biológica mejorada podrían ser un ingrediente en otros alimentos (Segura-Campos *et al.*, 2013b). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante durante la hidrólisis enzimática individual y en secuencia de un subproducto de la extracción de aceite chía.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se usó harina desgrasada de semillas de chía, que es el subproducto de la extracción del aceite, de la empresa Procesadora de Alimentos S.A. DE C.V. (PISA), en Guadalajara, Jalisco, México.

Obtención de la fracción rica en proteína (FRP)

La harina desgrasada se deshidrató a 60 °C por 24 h (Segura-Campos *et al.*, 2013a), se tamizaron (malla Tyler 100; 140 µm) lotes de 500 g (tamizador con agitación tipo Ro-Tap®) por 20 min. Para concentrar la proteína se aplicó el método de fraccionamiento seco descrito por Vázquez-Ovando *et al.* (2010).

Composición química proximal de la harina desgrasada y la fracción rica en proteína de chía

Para conocer la composición química se usaron los métodos descritos por la AOAC (2000), e incluyeron humedad (método 925.09), proteína cruda (método 954.01) por el método de Kjendal, y el factor 6.25, grasa cruda (método 920.39), fibra cruda (método 962.09), cenizas (método 923.03). Los carbohidratos

proteínas there may be inactive fragments or with low physiological activity, called bioactive peptides, that may be liberated from hydrolysis, with beneficial effects on the organism (Benitez *et al.*, 2008; Mulero *et al.*, 2011). The bioactive peptides in cereals and legumes may increase the value and the quality of the protein (Malaguti *et al.*, 2014). Interest over hydrolysates and antioxidant peptides derived from foods is centered on being used as antioxidant dietary supplements or as dietary preservatives (Ajibola *et al.*, 2011). In this regard, chia seeds provide benefits to health and are a source of biologically active peptides. Enzymatic hydrolysis produces bioactive peptides from diverse sources of proteins, such as chia seeds. The chia hydrolysates with improved biological activity could be an ingredient in other foods (Segura-Campos *et al.*, 2013b). Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity during individual and sequential enzymatic hydrolysis from a byproduct of the chia oil extraction.

MATERIALS AND METHODS

For this study, fat-free chia seed flour was used, which is the byproduct of the oil extraction, made by the company Procesadora de Alimentos S.A. DE C.V. (PISA), in Guadalajara, Jalisco, Mexico.

Obtaining the protein-rich fraction (PRF)

The fat-free flour was dehydrated at 60 °C for 24 h (Segura-Campos *et al.*, 2013a), it was sieved (Tyler sieve 100; 140 µm) in batches of 500 g (sieve with agitation type Ro-Tap®) for 20 min. To concentrate the protein, the dry fractioning method described by Vázquez-Ovando *et al.* (2010) was applied.

Proximal chemical composition of the chia fat-free flour and protein-rich fraction

In order to know the chemical composition, the methods described by the AOAC (2000) were used, and included moisture (method 925.09), raw protein (method 954.01) with the Kjendal method, and factor 6.25, raw fat (method 920.39), raw fiber (method 962.09), and ashes (method 923.03). The total carbohydrates represented the difference of 100 % minus the nitrogen-free extract.

Enzymatic hydrolysis of the chia protein-rich fraction

The PRF was hydrolyzed in batches with commercial enzymes Alcalase (ALC) and Flavourzyme (FLA) (Sigma-Aldrich; Sigma

totales representaron la diferencia de 100 % menos el extracto libre de nitrógeno.

Hidrólisis enzimática de la fracción rica en proteína de chíá

La FRP se hidrolizó por lotes con enzimas comerciales Alcalasa (ALC) y Flavourzyme (FLA) (Sigma-Aldrich; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y el método descrito por Segura-Campos *et al.* (2013b). Las enzimas Alcalasa® (P4860) son de *Bacillus licheniformis* y Flavourzyme® (P6110) de *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas comerciales son específicas a enlaces peptídicos de aminoácidos hidrofóbicos (ALC) y aminoácidos aromáticos (FLA). El factor evaluado fue el tiempo de reacción (30, 60, 90, 120 y 150 min) y se calculó el grado de hidrólisis (GH). La hidrólisis se realizó con: 1) las enzimas ALC y FLA separadas, y 2) con ALC-FLA. En este caso inició con pre digestión con ALC por 60 min y le siguió FLA por 150 min con sustrato al 2 % (enzima/sustrato en una proporción de 0.3 AU g⁻¹ de ALC), pH 7 y 50 LAPU g⁻¹ de FLA a pH 8, a 50 °C en ambos casos. La hidrólisis se suspendió por calentamiento a 85 °C, y 15 min. El hidrolizado se centrifugó (9880 x g, 20 min) para remover la porción insoluble (Pedroche *et al.*, 2002). El extracto se liofilizó y se almacenó -20 °C hasta su análisis.

Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El GH se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Nielsen *et al.* (2001); con los grupos amino libres identificados con orto-ftaldialdehído (OPA) se calcula: $GH = h/h_{tot} \times 100$; donde h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína y h es el número de enlaces hidrolizados. El factor h_{tot} depende de composición y tipo de aminoácidos de la materia prima. El número de enlaces peptídicos hidrolizados se calculó con una curva de calibración con 0, 50, 100, 150 y 200 µL de estándar serina al 0.1 % (p/v), la cual se mezcló con 1.5 mL de un reactivo de color preparado con 1.90 g de tetraborato de sodio decahidratado.

Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos se extrajeron de las muestras de harina desgrasada y FRP, se mezclaron con metanol (1:5, p:v) por 10 min, luego en un baño de agua a 50 °C por 1 h, después a 65 °C por 5 min y se enfriaron a 25 °C. El sobrenadante se pasó a través de un filtro Millipore de 0.45 µm (Castel *et al.*, 2014). El contenido de fenoles totales se midió con el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Rojas y Narváez (2009), en 20 µL de extracto a 765 nm en un espectrofotómetro (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA). La curva de calibración se preparó con

Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and the method described by Segura-Campos *et al.* (2013b). The enzyme Alcalase® (P4860) is from *Bacillus licheniformis*, and Flavourzyme® (P6110) from *Aspergillus oryzae*. These commercial enzymes are specific to peptide bonds of hydrophobic amino acids (ALC) and aromatic amino acids (FLA). The factor evaluated was the reaction time (30, 60, 90, 120 and 150 min) and the hydrolysis degree (HD) was calculated. The hydrolysis was performed with: 1) the enzymes ALC and FLA separately, and 2) with ALC-FLA. In this case, it began with pre-digestion with ALC for 60 min and FLA followed for 150 min with substrate at 2 % (enzyme/substrate in a proportion of 0.3 AU g⁻¹ of ALC), pH 7 and 50 LAPU g⁻¹ of FLA at pH 8, at 50 °C in both cases. Hydrolysis was suspended by heating at 85 °C, and 15 min. The hydrolysate was centrifuged (9880 x g, 20 min) to remove the insoluble portion (Pedroche *et al.*, 2002). The extract was lyophilized and was stored at -20 °C until its analysis.

Determination of the hydrolysis degree (HD)

The HD was determined by the spectrophotometric method described by Nielsen *et al.* (2001); with the free amino groups identified with ortho-phthalaldehyde (OPA) the following is calculated: $HD = h/h_{tot} \times 100$; where h_{tot} is the total number of peptide bonds per protein equivalent and h is the number of hydrolyzed bonds. The h_{tot} factor depends on the composition and type of amino acids in the raw material. The number of hydrolyzed peptide bonds was calculated with a calibration curve with 0, 50, 100, 150 and 200 µL of serine standard at 0.1 % (p/v), which was mixed with 1.5 mL of a color reactive prepared with 1.90 g of decahydrated sodium tetraborate.

Total phenolic compounds

The phenolic compounds were extracted from the fat-free flour samples and PRE, they were mixed with methanol (1:5, p:v) for 10 min, then placed in a water bath at 50 °C for 1 h, then at 65 °C for 5 min and cooled to 25 °C. The supernatant was passed through a Millipore filter of 0.45 µm (Castel *et al.*, 2014). The content of total phenols was measured with the Folin-Ciocalteu method, described by Rojas and Narváez (2009), in 20 µL of extract at 765 nm in a spectrophotometer (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA). The calibration curve was prepared with gallic acid between 50 and 500 mg L⁻¹. The results are expressed as equivalents of gallic acid (mg EAG g⁻¹ of flour).

DPPH radical scavenging capacity

DPPH radical scavenging was evaluated with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (J. T. Baker; Phillipsburg, NJ, USA;

ácido gálico entre 50 y 500 mg L⁻¹. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg EAG g⁻¹ de harina).

Capacidad captadora de radicales DPPH

La captación del radical DPPH se evaluó con 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (J. T. Baker; Phillipsburg, NJ, USA; y Merck, Darmstadt, Alemania), y el método descrito por Cumby *et al.*, (2008). Las muestras se disolvieron en etanol al 95 % (10 mg mL⁻¹), se mezclaron con solución etanólica de DPPH (50 µM) y la absorbancia se obtuvo a 517 nm en espectrofotómetro (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA). La captación del radical por los hidrolizados se calculó con la fórmula:

$$\text{Captación(\%)} = \left[\text{Abs}_{\text{control}} - \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

donde Abs_{control} es la absorbancia del radical DPPH sin hidrolizado, y Abs_{blanco} es la absorbancia de los hidrolizados sin DPPH debido a que las proteínas absorben a esta longitud de onda.

Actividad de captación de radicales ABTS*

Esta actividad se determinó el método descrito por Segura-Campos *et al.* (2013b), con 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfónico) (ABTS) y ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (J. T. Baker; Phillipsburg, NJ, USA; y Merck; Darmstadt, Alemania). El catión radical ABTS* producido por reacción de ABTS (2 mM) con persulfato de potasio. El catión radical ABTS* se produjo por reacción de 10 mL de solución madre de ABTS con solución 40 µL de K₂S₄O₈. El radical se mantuvo estable por 2 d, almacenado en la oscuridad y a temperatura ambiente. La actividad antioxidante en los hidrolizados se obtuvo por dilución de la solución de ABTS* con PBS en espectrofotómetro (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA) a 734 nm (absorbancia de 0.800±0.030). De la solución diluida de ABTS* se añadieron 990 µL a 10 µL del compuesto antioxidante Trolox o hidrolizado (10 mg mL⁻¹). La curva de calibración se preparó con Trolox (0.5-3.5 mM) en PBS. El porcentaje de disminución se calculó con la absorbancia y se representó como una función de la concentración de Trolox. La actividad de eliminación de radicales de las muestras analizadas en porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación:

$$\text{Inhibición(\%)} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100$$

donde A_B es la absorbancia de la muestra en blanco (t=0), y A_A es la absorbancia de la muestra con antioxidante después de 6 min.

and Merck, Darmstadt, Germany), and the method described by Cumby *et al.*, (2008). The samples were dissolved in ethanol at 95 % (10 mg mL⁻¹), mixed with DPPH ethanol solution (50 µM) and the absorbance was obtained at 517 nm in spectrophotometer (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA). Radical scavenging by the hydrolysates was calculated with the formula:

$$\text{Captación(\%)} = \left[\text{Abs}_{\text{control}} - \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

where Abs_{control} is the absorbance of the DPPH radical without hydrolysate, and Abs_{blanco} is the absorbance of hydrolysates without DPPH because the proteins absorb at this wave length.

Activity of ABTS* radical scavenging

This activity was determined by the method described by Segura-Campos *et al.* (2013b), with 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) (ABTS) and -6-hydroxy-2, 5, 7, 8 tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (J. T. Baker; Phillipsburg, NJ, USA; and Merck; Darmstadt, Alemania). The ABTS* radical cation, produced by ABTS reaction (2 mM) with potassium persulfate. The ABTS* radical cation was produced from a reaction of 10 mL of ABTS mother solution with 40 µL de K₂S₄O₈ solution. The radical was kept stable for 2 d, stored in darkness and at room temperature. The antioxidant activity in the hydrolysates was obtained from dilution of the ABTS* solution with PBS in spectrophotometer (ThermoScientific Genesys 10 UV, USA) at 734 nm (absorbance of 0.800±0.030). From the diluted ABTS* solution 990 µL were added to 10 µL from the Trolox or hydrolyzed antioxidant compound (10 mg mL⁻¹). The calibration curve was prepared with Trolox (0.5-3.5 mM) in PBS. The percentage of decrease was calculated with the absorbance and represented as a function of the Trolox concentration. The activity of radical elimination from the samples analyzed in percentage of inhibition was calculated with the equation:

$$\text{Inhibición(\%)} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100$$

where A_B is the absorbance of the blank sample (t=0), and A_A is the absorbance of the sample with antioxidant after 6 min.

The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was quantified through a regression analysis of the inhibition percentage versus the Trolox concentration, with the formula:

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se cuantificó con un análisis de regresión del porcentaje de inhibición frente a la concentración Trolox, con la fórmula:

$$TEAC = \frac{\%I_M - b}{m}$$

donde b es la intersección y m es la pendiente.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar en un arreglo factorial con dos factores (enzima y tiempo): enzima con tres niveles (ALC, FLA, sistema secuencial ALC - FLA); y tiempo con cinco niveles (30, 60, 90, 120 y 150 min) para cada tratamiento enzimático. Las comparaciones múltiples entre medias se realizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Estos análisis estadísticos se realizaron con SAS ver 9.1 (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico parcial

El contenido de proteína en FRP fue mayor que en la harina desgrasada. Este resultado coincide con el reportado por Vázquez-Ovando *et al.* (2013), quienes obtuvieron 32.24 g 100 g⁻¹ en harina desgrasada de chía e indicaron que al eliminar la fracción de fibra por tamizado aumentan las partículas finas con contenido mayor de proteínas. El contenido de cenizas en FRP fue mayor que en la harina, probablemente por la concentración alta de minerales de las semillas de chía (Capitani *et al.*, 2012) y porque estos tienden a permanecer en las fracciones de menor tamaño (Vázquez-Ovando *et al.*, 2009). Los resultados fueron cercanos a los de la ficha técnica de la empresa proveedora, 52 % de fibra, 29 % de proteína y 7 % de grasa. El componente más abundante en la harina de chía fue la fibra (Cuadro 1), lo cual coincidió con el contenido de 40 a 60 % en el remanente de la extracción de aceite (Tosco, 2004). El contenido de grasa fue similar al reportado (13.44 g 100 g⁻¹) por Segura-Campos (Segura-Campos, 2013, *Biological potential of chia (Salvia hispanica L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods*) *et al.* (2013b).

$$TEAC = \frac{\%I_M - b}{m}$$

where b is the intersection and m is the slope.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely random in a factorial arrangement with two factors (enzyme and time): enzyme with three levels (ALC, FLA, ALC-FLA sequential system); and time with five levels (30, 60, 90, 120 and 150 min) for each enzymatic treatment. The multiple comparisons between means were carried out with the Tukey test ($p \leq 0.05$). These statistical analyses were performed with SAS. ver 9.1 (2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Partial chemical analysis

The protein content in the PRF was higher than in the fat-free flour. This result agrees with the one reported by Vázquez-Ovando *et al.* (2013), who obtained 32.24 g 100 g⁻¹ in chia fat-free flour and indicated that when eliminating the fiber fraction through sieving, the fine particles with higher protein content were increased. The ash content in the PRF was higher than in the flour, probably because of the high concentration of minerals in chia seeds (Capitani *et al.*, 2012) and because these tend to remain in the

Cuadro 1. Composición proximal de la harina desengrasada y la fracción rica en proteína de chía (*Salvia hispanica* L.) (g 100 g⁻¹ en b.s.).

Table 1. Proximal composition of the chia (*Salvia hispanica* L.) fat-free flour and protein-rich fraction (g 100 g⁻¹ in b.s.).

Componentes	Harina desgrasada de chía*	Fracción rica en proteína*
Humedad (%)	4.75±0.13	5.17±0.09
Ceniza (%)	6.40±0.06	7.02±0.04
Fibra cruda (%)	45.64±0.59	36.44±1.26
Grasa (%)	11.20±0.23	1.58±0.11
Proteína (%)	28.86±0.14	39.64±0.47
Extracto libre de nitrógeno (por diferencia, %)	7.86	15.30

*Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar. ♦ *The values shown correspond to the mean ± standard deviation.

Hidrólisis enzimática de la fracción rica en proteínas

La diferencia en GH fue significativa entre los tratamientos. Las curvas de hidrólisis (Figura 1) típicas de hidrólisis enzimática de proteína (Figueroa *et al.*, 2013) mostraron un incremento acelerado en los primeros minutos. La FRP de chía puede considerarse material de partida adecuado para la producción de hidrolizados proteicos (Segura-Campos *et al.*, 2013) debido al GH extensivo obtenido (>40 %).

El patrón que siguió cada cinética en el tiempo fue diferente para cada enzima y hubo efecto de la interacción entre tiempo y enzima. Durante las hidrólisis con ALC y FLA se presentó disminución de los 30 a los 60 min e incremento de los 60 a los 120 min. Candido y Sgarbieri (2003) reportaron el mismo comportamiento en hidrólisis de proteínas miofibrilares de tilapia con FLA. La disminución en la tasa de hidrólisis puede deberse a inhibición enzimática por productos de la reacción, desnaturalización parcial de la enzima, competencia entre proteína no hidrolizada y péptidos que empiezan a formarse constantemente durante el proceso de hidrólisis (Candido y Sgarbieri, 2003; Kong *et al.*, 2007).

La disminución también se observó en la hidrólisis proteica de girasol con ALC, con los valores mayores a los 30 min de digestión (Megias *et al.*, 2008). Yust *et al.* (2003) reportaron un valor de 27 para

smaller fractions (Vázquez-Ovando *et al.*, 2009). The results were close to those from the technical file card of the supplying company, 52 % of fiber, 29 % of protein and 7 % of fat. The most abundant component in chia flour was the fiber (Table 1), which agreed with the content of 40 to 60 % in the remnant of the oil extraction (Tosco, 2004). The fat content was similar to the one reported (13.44 g 100 g⁻¹) by Segura-Campos (Segura-Campos, 2013, *Biological potential of chia (Salvia hispanica L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods* et al (2013b).

Enzymatic hydrolysis of the protein-rich fraction

The difference in HD was significant between treatments. The hydrolysis curves (Figure 1) typical of enzymatic protein hydrolysis (Figueroa *et al.*, 2013) showed an accelerated increase in the first minutes. The chia PRF can be considered adequate starting material for the production of protein hydrolysates (Segura-Campos *et al.*, 2013) due to the extensive HD obtained (>40 %).

The pattern followed by each kinetics in time was different for each enzyme and there was an effect from the interaction between time and enzyme. During the hydrolysis with ALC and FLA there was a decrease from 30 to 60 min and an increase from 60 to 120 min. Candido and Sgarbieri (2003) reported the same behavior in hydrolysis of tilapia miofibrillar proteins with FLA. The decrease in the hydrolysis rate can be due to the enzymatic inhibition resulting from the reaction's products, partial denaturalization of the enzyme, competition between non-hydrolyzed protein and peptides that begin to form constantly during the hydrolysis process (Candido and Sgarbieri, 2003; Kong *et al.*, 2007).

The decrease was also observed in sunflower protein hydrolysis with ALC, with values higher than 30 min of digestion (Megias *et al.*, 2008). Yust *et al.* (2003) reported a value of 27 for hydrolyzed chickpea with ALC at 30 min. The gradual increase was present until 120 min and the stationary phase until 150 min. This phase can result from the decrease in the concentration of peptide bonds (Márquez and Vázquez, 1999). ALC acts as an endo-peptidase, which split peptide bonds inside the polypeptide chain; FLA acts as endo- and exo- peptidase (Cumby *et al.*, 2008). Thus, ALC produces mainly small

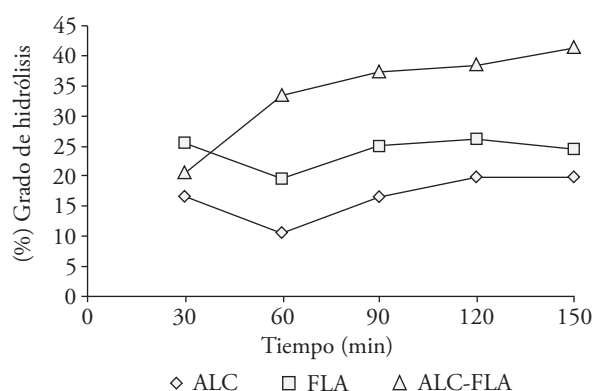


Figura 1. Grado de hidrólisis de la fracción rica en proteínas de chía (*Salvia hispanica* L.) con alcalasa (ALC), flavourzima (FLA) y ambas en secuencia (ALC-FLA).

Figure 1. Hydrolysis degree of the chia (*Salvia hispanica* L.) protein-rich fraction with alcalase (ALC), flavourzyme (FLA) and both in sequence (ALC-FLA).

garbanzo hidrolizado con ALC a los 30 min. El aumento paulatino se presentó hasta los 120 min y la fase estacionaria a los 150 min. Esta fase puede resultar de la disminución en la concentración de enlaces peptídicos (Márquez y Vázquez, 1999). ALC actúa como endo-peptidasa, que escinde enlaces peptídicos del interior de la cadena polipeptídica; FLA actúa como endo y exo peptidasa (Cumby *et al.*, 2008). Así, ALC produce principalmente oligopéptidos/polipéptidos pequeños y medianos y FLA produce más componentes de bajo peso molecular y aminoácidos libres (Hamada, 2000).

En el presente estudio, ALC exhibió especificidad un amplia y produjo hidrolizados con GH entre 10 y 19.88 %. Estos resultados son mayores a los reportados por Marrufo-Estrada *et al.* (2013) en hidrolizados de *J. curcas* con ALC (13.9 %) y Li *et al.* (2005) con hidrolizados de *Phaseolus radiatus* (10 %) con GH. Pero coinciden con lo reportado por Villanueva (1999) en hidrolizados de girasol con ALC y FLA (34.7 y 42.2), mientras que Karamác *et al.* (2016) reportaron una hidrólisis mayor con FLA que con ALC en linaza.

La hidrólisis enzimática de proteínas con frecuencia conduce a la producción de un intenso sabor amargo, debido a la presencia de péptidos hidrofóbicos y la reducción del número de aminoácidos aromáticos en los hidrolizados proteínicos mejora su sabor (Torruco *et al.*, 2008). Para lograr lo anterior se usan enzimas en secuencia, con lo cual la hidrólisis aumenta y el contenido de aminoácidos hidrofóbicos se reduce.

En un estudio con enzimas comerciales (ALC y FLA) se obtuvieron hidrolizados proteicos con un GH de 65 %, debido a que ALC incrementa el número de sitios de N-terminales lo cual facilita la hidrólisis por FLA que presenta ambas actividades (Pedroche *et al.*, 2002). En nuestro estudio, la hidrólisis en secuencia (ALC-FLA), con pre-digestión con ALC, por 60 min, alcanzó hidrólisis extensiva con máximos de 41.2 % con FLA, a los 150 min; el GH fue menor al 43.8 % reportado por Segura-Campos *et al.*, (2013b), con la misma secuencia en chí, y por Ruiz *et al.* (2013) para hidrolizados de frijoles duros, cocidos, de 43.01 % con la secuencia ALC-FLA. Clemente *et al.* (1999b) observaron que la combinación de estas enzimas en un proceso de hidrólisis de dos pasos (3 h ALC como endoproteasa y 5 h FLA como exoproteasa) en garbanzo produjo GH >50 %.

and medium oligopeptides/polypeptides and FLA produces more components of low molecular weight and free amino acids (Hamada, 2000).

In this study, ALC exhibited a broad specificity and produced hydrolysates with HD between 10 and 19.88 %. These results are higher than those reported by Marrufo-Estrada *et al.* (2013) in hydrolysates of *J. curcas* with ALC (13.9 %) and Li *et al.* (2005) with hydrolysates of *Phaseolus radiatus* (10 %) with HD. But they agree with what is reported by Villanueva (1999) in sunflower hydrolysates with ALC and FLA (34.7 and 42.2), while Karamác *et al.* (2016) reported higher hydrolysis with FLA than with ALC in flaxseed.

The enzymatic hydrolysis of proteins frequently leads to the production of an intense bitter flavor, due to the presence of hydrophobic peptides, and the reduction of the number of aromatic amino acids in protein hydrolysates improves its flavor (Torruco *et al.*, 2008). To achieve this, sequential enzymes are used, with which the hydrolysis increases and the content of hydrophobic amino acids is reduced.

In a study with these commercial enzymes (ALC and FLA), protein hydrolysates were obtained with HD of 65 %, because ALC increases the number of sites of N-terminals which facilitates the hydrolysis by FLA that presents both activities (Pedroche *et al.*, 2002). In our study, sequential hydrolysis (ALC-FLA), with pre-digestion with ALC, for 60 min, reached extensive hydrolysis with maximums of 41.2 % with FLA, at 150 min; the HD was lower than 43.8 % reported by Segura-Campos *et al.*, (2013b), with the same sequence in chia and by Ruiz *et al.* (2013) for hydrolysates of hard, cooked, beans, of 43.01 % with the ALC-FLA sequence. Clemente *et al.* (1999b) observed that the combination of these enzymes is a two-step hydrolysis process (3 h ALC as endoprotease and 5 h FLA as exoprotease) in chickpea produced HD >50 %.

Total phenolic compounds and antioxidant activity of chia flour and PRF

The activity of antioxidants in foods and biological systems depends on factors such as the nature of the antioxidant compound, its concentration and the interaction present between them. The residues from the oil extraction process from oleaginous seeds contain phenolic compounds with antioxidant

Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de harina y FRP de chía

La actividad de los antioxidantes en los alimentos y los sistemas biológicos depende de factores como la naturaleza del compuesto antioxidante, su concentración y la interacción que exista entre ellos. Los residuos del proceso de extracción de aceite de las semillas oleaginosas contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante que las hace adecuadas como antioxidantes naturales de grasas y aceites (Matthäus, 2002).

La actividad antioxidante (Cuadro 2) fue similar al reportado por Marineli *et al.* (2014) en semillas chilenas de chía ($436.61 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$), por Capitani *et al.* (2012) en harina de chía, residuo de la extracción de aceite por prensado ($557.2 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$), y por Vázquez-Ovando *et al.* (2009) en fracciones fibrosa ($446.4 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ y $488.8 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$). Valores mayores se obtuvieron en harina de trigo y cebada y sorgo (8.3 , 14.9 y $51.7 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$, respectivamente) (Ragaei *et al.*, 2006) y similares al salvado de sorgo, con contenido alto de taninos $512.0 \mu\text{mol TEAC/g}$ (Awika *et al.*, 2003). Los resultados son menores a los valores reportados por Saura-Calixto y Goñi (2006) para vino tinto, infusión de café e infusión de té ($1093 \mu\text{mol TEAC}$

activity that makes them adequate as natural antioxidants of fats and oils (Matthäus, 2002).

The antioxidant activity (Table 2) was similar to that reported by Marineli *et al.* (2014) in Chilean chia seeds ($436.61 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$), by Capitani *et al.* (2012) in chia flour, residue from pressed oil extraction ($557.2 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$), and by Vázquez-Ovando *et al.* (2009) in fibrous fractions ($446.4 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ and $488.8 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$). Higher values were obtained in wheat and barley and sorghum flour (8.3 , 14.9 and $51.7 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$, respectively) (Ragaei *et al.*, 2006) and similar to sorghum bran, with high tannin content of $512.0 \mu\text{mol TEAC/g}$ (Awika *et al.*, 2003). The results are lower than the values reported by Saura-Calixto and Goñi (2006) for red wine, coffee infusion and tea infusion ($1093 \mu\text{mol TEAC 100 mL}^{-1}$, $1328 \mu\text{mol TEAC 100 mL}^{-1}$, $631 \mu\text{mol TEAC 100 mL}^{-1}$).

These values of antioxidant activity are because the chia seeds and oil contain natural antioxidants such as tocopherols, phytosterols, carotenoids (Alvarez *et al.*, 2008; Ixtaina *et al.*, 2011) and phenolic compounds, such as chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, myricetin, kaempferol and hydroxytyrosol (Reyes *et al.*, 2008; Capitani *et al.*, 2012).

The content of total phenols (Table 2) were close to those reported by Reyes *et al.* (2008) (0.88 a $0.92 \text{ mg EAG g}^{-1}$) in chia seeds from Jalisco and Sinaloa, and those by Marineli *et al.* (2014) ($0.94 \text{ mg EAG g}^{-1}$) in Chilean chia seeds.

Antioxidant activity from protein hydrolysates

The activity of ABTS radical elimination expressed as the Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) measures the antioxidant activity from a substance in comparison to the standard Trolox (Samaranayaka and Li-Chan, 2011). The hydrolysate with sequential system presented higher TEAC value than the hydrolysates with individual enzymes (Figure 2).

The highest TEAC value from the hydrolysis kinetics with ALC was reached at minute 60 with $10.96 \pm 0.26 \text{ mmol L}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$, which was higher than the value reported by Torruco *et al.* (2009) for hydrolysates from lima bean (*P. lunatus*) at minute 90 ($9.89 \text{ mmol L}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and Jamapa bean (*P. vulgaris*) at minute 60 ($10.09 \text{ mmol L}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) when hydrolyzed with ALC. It was also higher than the value observed by Vastag

Cuadro 2. Actividad antioxidante de harina desgrasada y fracción rica en proteína (FRP) de chía (*Salvia hispanica* L.).

Table 2. Antioxidant activity of chia (*Salvia hispanica* L.) fat-free flour and protein rich fraction (PRF).

	Harina desengrasada	FRP
Compuestos fenólicos totales (mg EAG g ⁻¹)	0.81±0.02	0.59±0.00
Actividad antioxidante (métodos)		
DPPH (μmol TEAC g ⁻¹)	433.28±2.24	415.47±6.92
ABTS (μmol TEAC g ⁻¹)	476.63±9.78	411.12±7.24

*Los datos están expresados como el valor de las medias ± desviación estándar. ♦ *The data are expressed as the value of the means ± standard deviation.

EAG: Equivalentes de ácido gálico, TEAC: Actividad antioxidante equivalente de Trolox. ♦ EAG: Gallic acid equivalents, TEAC: Trolox equivalent antioxidant activity.

100 mL⁻¹, 1328 μ mol TEAC 100 mL⁻¹, 631 μ mol TEAC 100 mL⁻¹).

Estos valores de actividad antioxidante se deben a que las semillas y el aceite de chía contienen antioxidantes naturales como tocoferoles, fitoesteroles, carotenoides (Alvarez *et al.*, 2008; Ixtaina *et al.*, 2011) y compuestos fenólicos, como ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina, miricetina, kaempferol e hidroxitirosol (Reyes *et al.*, 2008; Capitani *et al.*, 2012).

Los contenidos de fenoles totales (Cuadro 2) fueron cercanos a los reportado por Reyes *et al.* (2008) (0.88 a 0.92 mg EAG g⁻¹) en semillas de chía de Jalisco y Sinaloa, y los de Marineli *et al.* (2014) (0.94 mg EAG g⁻¹) en semillas chilenas de chía.

Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos

La actividad de eliminación del radical ABTS expresado como la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), mide la actividad antioxidante de una sustancia en comparación con el estándar Trolox (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). El hidrolizado con sistema secuencial presentó mayor valor TEAC que los hidrolizados con enzimas individuales (Figura 2).

El valor mayor de TEAC de la cinética de hidrólisis con ALC se alcanzó al minuto 60 con 10.96 ± 0.26 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína, lo cual fue mayor al reportado por Torruco *et al.* (2009) para hidrolizados de frijol lima (*P. lunatus*) al minuto 90 (9.89 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína) y frijol Jamapa (*P. vulgaris*) al minuto 60 (10.09 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína) al ser hidrolizados con ALC. También fue mayor al valor observado por Vastag *et al.* (2011) para hidrolizados con ALC de un aislado obtenido de la torta residual de extracción de aceite de calabaza a 60 min con valores de 7.59 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína. Por el contrario, Marrufo-Estrada *et al.*, (2013) encontraron valores mayores que los de nuestro estudio, para hidrolizados de harina desgrasada y aislado de *J. curcas* con ALC de 13.43 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína y 12.28 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína, respectivamente.

La hidrólisis con FLA en nuestro estudio fue mayor al minuto 150 con 10.0 ± 0.16 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína que el reportado por Torruco *et al.*, (2009) en frijol lima (8.42 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína) a los 45 min, pero menor que para frijol Jamapa al minuto 90 (11.55 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína). ALC presentó valores TEAC mayores, que FLA, lo cual puede deberse a que ALC exhibe el grupo serina en su sitio

et al., (2011) for hydrolysates with ALC from an isolate obtained from the residual cake of squash oil extraction at 60 min with values of 7.59 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein. Contrary to this, Marrufo-Estrada *et al.*, (2013) found higher values than those in our study, for fat-free flour hydrolysates and isolate from *J. curcas* with ALC of 13.43 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein and 12.28 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein, respectively.

The hydrolysis with FLA in our study was higher at minute 150 with 10.0 ± 0.16 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein than what was reported by Torruco *et al.* (2009) in lima bean (8.42 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein) at 45 min, but lower than for Jamapa bean at minute 90 (11.55 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein). ALC presented higher TEAC values than FLA, which can be because ALC exhibits the serine group in its active site and has endopeptidase activity beginning on the C-terminal end, hydrolyze with broad specificity, and liberate peptides with hydrophobic amino acids such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan, leucine, isoleucine, valine and methionine (Doucet *et al.*, 2003; Torruco *et al.*, 2009). Those amino acids are attributed with biological activities, with higher yields and they develop shorter bioactive peptides and resistant to digestive enzymes, as compared to other proteases (Sarmadi and Ismail, 2010). The difference in the TEAC values observed between the hydrolysates produced by ALC and FLA indicates that the protein hydrolysates and peptides for different enzymes alter the antioxidant potential of the products.

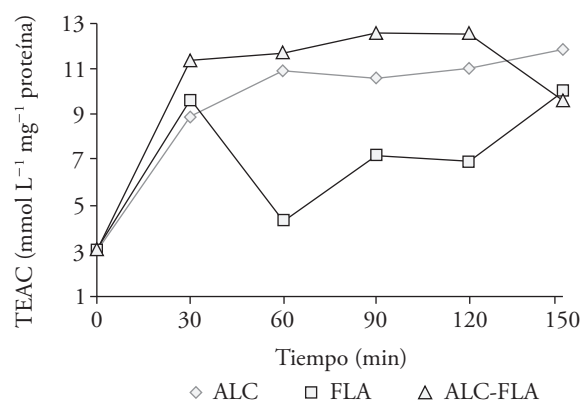


Figura 2. Actividad antioxidante (TEAC) de hidrolizados proteicos enzimáticos de chía (*Salvia hispanica* L.) por ABTS.

Figure 2. Antioxidant activity (TEAC) of enzymatic protein hydrolysates from chia (*Salvia hispanica* L.) by ABTS.

activo y posee actividad endopeptidasa comenzando en el extremo C-terminal, hidrolizan con amplia especificidad, y libera péptidos con aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina, valina y metionina (Doucet *et al.*, 2003; Torruco *et al.*, 2009). A esos aminoácidos se les atribuye actividades biológicas, con rendimientos más altos y desarrollan péptidos bioactivos más cortos y resistentes a las enzimas digestivas en comparación con otras proteasas (Sarmadi e Ismail, 2010). La diferencia de los valores TEAC observados entre los hidrolizados producidos por ALC y FLA indica que los hidrolizados de proteínas y péptidos por diferentes enzimas alteran el potencial antioxidante de los productos.

La capacidad antioxidante de un péptido depende de su composición (Saito *et al.*, 2003). Los tripéptidos que exponen triptófano o tirosina en el C-terminal muestran captación de radicales. El valor TEAC más alto para el hidrolizado producido con el sistema secuencial fue a los 90 min con 12.56 ± 0.01 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína, seguido por el de 120 min con 12.50 ± 0.07 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína. Estos valores fueron mayores a los reportados por Segura-Campos *et al.* (2013b) con TEAC mayor en el hidrolizado de chía, por 90 min de reacción (7.31 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína). En contraste, fueron menores a los observados por Marrufo-Estrada *et al.* (2013) con proteína hidrolizada de *J. curcas*, con pepsina-pancreatina en secuencia (14.66 TEAC mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína), y por Ruiz *et al.* (2013) (15.06 mmol L⁻¹ mg⁻¹ proteína) en hidrolizados de frijol duro, cocido y con ALC-FLA en secuencia.

En las tres cinéticas los hidrolizados presentaron TEAC mayor que el material original (3.05 ± 0.09 mmol L⁻¹ mg⁻¹). El aumento de la actividad antioxidante en proteínas hidrolizadas también se observó en productos lácteos, soja, zeína, patata, gelatina y yema de huevo y se ha relacionado con la exposición mayor de aminoácidos al disolvente (Elias *et al.*, 2008).

La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes de alimentos tienen pesos moleculares de 500 a 1800 Da (Zhang *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2013; Girgih *et al.*, 2015). Además, a menudo incluyen residuos de aminoácidos hidrofóbicos como valina o leucina en el extremo N-terminal de los péptidos y prolina, histidina, tirosina, triptófano, metionina y cisteína en sus secuencias (Elias *et al.*, 2008). Los 20 aminoácidos en las proteínas pueden interactuar con

The antioxidant capacity of a peptide depends on its composition (Saito *et al.*, 2003). The tripeptides that expose tryptophan or tyrosine in the C-terminal show radical scavenging. The highest TEAC value for the hydrolysate produced with the sequential system was at 90 min with 12.56 ± 0.01 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein, followed by that at 120 min with 12.50 ± 0.07 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein. These values were higher than those reported by Segura-Campos *et al.* (2013b) with higher TEAC in the chia hydrolysate, for 90 min of reaction (7.31 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein). In contrast, those observed by Marrufo-Estrada *et al.* (2013) were lower with *J. curcas* hydrolyzed protein, with pepsin-pancreatin in sequence (14.66 TEAC mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein), and by Ruiz *et al.* (2013) (15.06 mmol L⁻¹ mg⁻¹ protein) in hard, cooked, bean hydrolysates and with sequential ALC-FLA.

In the three kinetics, the hydrolysates presented higher TEAC than the original material (3.05 ± 0.09 mmol L⁻¹ mg⁻¹). The increase in antioxidant activity in hydrolyzed proteins was also observed in dairy products, soy, zein, potato, gelatin, and egg yolk, and has been related to the greater exposure of amino acids to the solvent (Elias *et al.*, 2008).

Most of the antioxidant peptides derived from food sources have molecular weights of 500 to 1800 Da (Zhang *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2013; Girgih *et al.*, 2015). In addition, they often include residues of hydrophobic amino acids such as valine or leucine in the N-terminal end of the peptides and proline, histidine, tyrosine, tryptophan, methionine and cysteine in their sequences (Elias *et al.*, 2008). The 20 amino acids in the proteins can interact with the free radicals if the energy from the free radical is high. However, the free amino acids are not efficient as antioxidants in biological systems and foods, and the extensive proteolysis of proteins decreases the antioxidant activity (Samaranayaka and Li-Chan, 2011). This explains the reduction in the TEAC value for the extensive hydrolysate of the sequential system at minute 120, as well as the influence of the type of enzyme used in the hydrolyses, because as time passed and the HD increased, the FLA enzyme probably broke bonds in the amino acids that were part of the peptides that presented antioxidant action.

In the DPPH test, the radical scavenging activity increased with the increment of the percentage of

los radicales libres si la energía del radical libre es alta. Sin embargo, los aminoácidos libres no son eficaces como antioxidantes en sistemas biológicos y alimentos, y la extensa proteólisis de proteínas disminuye la actividad antioxidante (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Lo anterior explica la reducción en el valor de TEAC para el hidrolizado extensivo del sistema secuencial al minuto 120, así mismo la influencia del tipo de enzima utilizada en las hidrólisis, debido a que a medida que transcurrió el tiempo y aumentó el GH, la enzima FLA probablemente rompió enlaces de los aminoácidos que formaban parte de los péptidos que presentaban acción antioxidante.

En la prueba DPPH, la actividad de captación de radicales aumentó con el incremento del porcentaje de inhibición de radicales libres. Por lo tanto, la actividad antioxidante de la sustancia se puede expresar como la capacidad de barrido del radical DPPH (Ajibola *et al.*, 2011). Los valores de la actividad antioxidante de los hidrolizados por DPPH muestran que son dependientes del tratamiento de hidrólisis enzimática empleada (Figura 3).

Para los hidrolizados con ALC el valor más alto fue 71.11 ± 1.65 % al minuto 60, para FLA 67.99 ± 0.34 % al minuto 90 y para el sistema secuencial al minuto 90 con 77.47 ± 0.50 %. El sistema secuencial presentó los valores más altos en todos los tiempos de digestión. Los resultados de actividad antioxidante obtenidos en nuestro estudio empleando ALC individual y el sistema secuencial fueron similares a los obtenidos por Cumby *et al.* (2008) en hidrolizados de proteína de canola (70.2 % y 69.1 %, respectivamente), pero el valor para la hidrólisis individual con FLA reportada por dichos autores fue mayor (73.2 %). La actividad antioxidante en nuestro estudio fue mayor a los reportados por Valdez *et al.* (2012) en hidrolizados proteicos de frijoles azufrados de tres variedades con ALC (44.05 %), termolisina (34.03 %) y pancreatina (33.90 %). Valdez *et al.* (2012) utilizaron hidrolizados proteicos con concentración de 1 mg mL^{-1} , pero en nuestro estudio se usaron 10 mg mL^{-1} . Zhang *et al.* (2010) encontraron actividades de barrido del radical DPPH hasta de 29 % en hidrolizados de proteína de soya obtenida con ALC con una concentración de 100 mg mL^{-1} . Xie *et al.* (2008) reportaron valores de 80 % de actividad de barrido del radical DPPH en péptidos aislados de un hidrolizado proteico de hojas de alfalfa.

inhibition of free radicals. Therefore, the antioxidant activity of the substance can be expressed as the DPPH radical sweeping capacity (Ajibola *et al.*, 2011). The values of the antioxidant activity of the hydrolysates by DPPH show that they depend on the enzymatic hydrolysis treatment used (Figure 3).

For hydrolysates with ALC the highest value was 71.11 ± 1.65 % at minute 60, for FLA 67.99 ± 0.34 % at minute 90, and for the sequential system at minute 90 with 77.47 ± 0.50 %. The sequential system presented the highest values in all the digestion times. The results from the antioxidant activity obtained in our study using individual ALC and the sequential system were similar to those obtained by Cumby *et al.* (2008) in hydrolysates from canola protein (70.2 % and 69.1 %, respectively), although the value for individual hydrolysis with FLA reported by those authors was higher (73.2 %). The antioxidant activity in our study was higher than what was reported by Valdez *et al.*, (2012) in protein hydrolysates from yellow bean of three varieties with ALC (44.05 %), thermolysin (34.03 %) and pancreatin (33.90 %). Valdez *et al.* (2012) used protein hydrolysates with concentration of 1 mg mL^{-1} , but 10 mg mL^{-1} were used in our study. Zhang *et al.* (2010) found DPPH radical sweeping activities of up to 29 % in hydrolysates from soy protein obtained with ALC with a concentration of 100 mg mL^{-1} . Xie *et al.* (2008) reported values of 80 % for DPPH radical sweeping activity in peptides

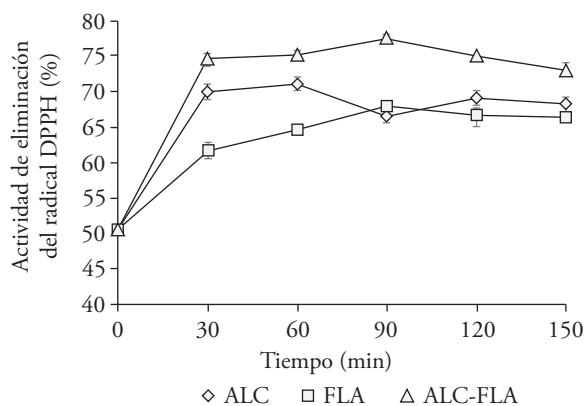


Figura 3. Actividad de eliminación del radical DPPH de hidrolizados proteicos de chíá (*Salvia hispanica* L.).

Figure 3. Activity of DPPH radical scavenging of protein hydrolysates from chia (*Salvia hispanica* L.).

Li *et al.* (2008) reportaron valores menores de una fracción de hidrolizado de proteína de garbanzo con ALC durante 40 min con 85.82 %. Ajibola *et al.* (2011) observaron actividad de 2.29 % en un hidrolizado proteico en ñame africano con ALC. Girgih *et al.* (2015) encontraron 19 % de actividad de barrido del radical DPPH en muestras de 1 mg mL⁻¹ de proteína de bacalao hidrolizadas en secuencia con pepsina y tripsina-quimotripsina.

Los resultados de nuestro estudio coincidieron con los de Yust *et al.* (2012) en hidrolizados de garbanzo ALC-FLA en secuencia; en estos la hidrólisis con ALC aumentó, hasta 50 %, el efecto de eliminación de radicales DPPH y la hidrólisis posterior con FLA aumentó la actividad de barrido de radicales DPPH hasta 77 %. Estos fueron más altos que los de hidrolizados de chía. La hidrólisis con ALC, comparado con FLA fue adecuada para la producción de hidrolizados proteicos bioactivos y mostraron capacidad para captar radicales libres. La especificidad de ALC para liberar péptidos con aminoácidos hidrofóbicos podría explicar la mayor actividad antirradical frente al DPPH. Pero, la actividad antioxidante fue mayor en los hidrolizados con la secuencia ALC-FLA que con FRP.

Otros componentes de la materia prima, como compuestos fenólicos, pueden permanecer y extraerse durante la hidrólisis enzimática y contribuir a la actividad antioxidante de los hidrolizados. También, la actividad antioxidante determinada, inclusive en la misma muestra inicial, podría depender del método empleado (López *et al.*, 2014).

Las pruebas DPPH y ABTS se usan para evaluar el potencial antioxidante de hidrolizados y péptidos. Pero cada uno mide una propiedad antioxidante que representa un mecanismo diferente, que puede no reflejar la eficiencia de las muestras en el retraso o la inhibición de la oxidación de lípidos en un sistema alimentario (Zhuang *et al.*, 2013). Por lo anterior, la actividad antioxidante alta con los dos métodos en nuestro estudio se puede atribuir al efecto combinado de los péptidos liberados durante la hidrólisis enzimática y los compuestos fenólicos residuales en FRP.

CONCLUSIONES

La hidrólisis enzimática en sistema secuencial incrementa la hidrólisis desde 60 hasta 120 min en

isolated from a protein hydrolysate from alfalfa leaves.

Li *et al.* (2008) reported values lower than a fraction of protein hydrolysate from chickpea with ALC for 40 min with 85.82 %. Ajibola *et al.* (2011) observed activity of 2.29 % in a protein hydrolysate from African yam with ALC. Girgih *et al.* (2015) found 19 % of DPPH radical sweeping activity in samples of 1 mg mL⁻¹ of hydrolyzed cod proteins in sequence with pepsin and trypsin-chymotrypsin.

The results from our study agreed with those by Yust *et al.* (2012) in hydrolysates from chickpea with sequential ALC-FLA; in these the hydrolysis with ALC increased, up to 50 %, the effect from DPPH radical elimination and the later hydrolysis with FLA increased the DPPH radical sweeping activity in up to 77 %. These were higher than the chia hydrolysates. The hydrolysis with ALC, compared to FLA, was adequate for the production of bioactive protein hydrolysates and showed capacity to sweep free radicals. The specificity of ALC to liberate peptides with hydrophobic amino acids could explain the higher antiradical activity in face of DPPH. However, the antioxidant activity was higher in the hydrolysates with sequential ALC-FLA than with PRF.

Other components of the raw material, such as phenolic compounds, can remain and be extracted during enzymatic hydrolysis and contribute to the antioxidant activity of the hydrolysates. Also, the antioxidant activity determined, even in the same initial sample, could depend on the method used (López *et al.*, 2014).

The DPPH and ABTS tests are used to evaluate the antioxidant potential of hydrolysates and peptides. But each one measures an antioxidant property that represents a different mechanism, which cannot reflect the efficiency of the samples in the delay or inhibition of the oxidation of lipids in a food system (Zhuang *et al.*, 2013). Because of this, the high antioxidant activity with the two methods in our study can be attributed to the combined effect of the peptides liberated during enzymatic hydrolysis and the residual phenolic compounds in the PRF.

CONCLUSIONS

Enzymatic hydrolysis in the sequential system increases the hydrolysis from 60 to 120 min compared

comparación con la hidrólisis con enzimas individuales. Las enzimas de FRP de chíá con proteasas comerciales, como ALC y FLA, produjeron hidrolizados con actividad antioxidante para eliminar radicales libres, en comparación con el subproducto de la extracción de aceite de chíá sin hidrólisis enzimática. La actividad antioxidante medida por la técnica ABTS y la actividad de eliminación del radical DPPH incrementa con los hidrolizados por el sistema secuencial ALC-FLA respecto a los hidrolizados con enzimas individuales. La hidrólisis enzimática de los subproductos de la extracción de aceite de chíá tiene el potencial para desarrollar ingredientes con actividad antioxidante para la industria de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), del CINVESTAV, unidad Querétaro, del Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba y de las líneas prioritarias de investigación LPI-12 (Agregación de Valor) y LPI-13 (Comunidades agrarias, ejidos y conocimiento local) por las facilidades y financiamiento para la realización de la investigación.

LITERATURA CITADA

- Ajibola, C. F., J. B. Fashakin, T. N. Fagbemi, and R. E. Aluko. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 6685-6702.
- Alvarez C, L. M., M. D. Valdivia L, M. D. Aburto Juarez, and A. Tecante. 2008. Chemical characterization of the lipid fraction of mexican chíá seed (*Salvia hispanica* L.). *Int. J. Food Prop.* 11: 687-697.
- Awika, J. M., L. W. Rooney, X. Wu, R. L. Prior, and L. Cisneros-Zevallos. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6657-6662.
- Benitez, R., A. Ibarz, and J. Pagan. 2008. Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 42: 227-236.
- Candido L., M. B., and V. C. Sgarbieri. 2003. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. *J. Sci. Food Agric.* 83: 937-944.
- Capitani, M. I., V. Y. Ixtaina, S. M. Nolasco, and M. C. Tomas. 2013. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chíá (*Salvia hispanica* L.) Nutlets from Argentina. *J. Sci. Food Agric.* 93: 3856-3862.
- Capitani, M. I., V. Spotorno, S. M. Nolasco, and M. C. Tomás. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chíá (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT. Food Sci. Technol.* 45: 94-102.
- Castel, V., O. Andrich, F. N. Netto, L. G. Santiago, and C. R. Carrara. 2014. Total phenolic content and antioxidant activity of different streams resulting from pilot-plant processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates. *J. Food Engin.* 122: 62-67.
- Clemente, A., J. Vioque, R. Sánchez-Vioque, J. Pedroche, J. Bautista, and F. Millán. 1999a. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chem.* 67: 269-274.
- Clemente, A., J. Vioque, R. Sanchez-Vioque, J. Pedroche, and F. Millán. 1999b. Production of Extensive Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3776-3781.
- Corona-Jiménez, E., N. Martínez-Navarrete, H. Ruiz-Espinosa, and J. Carranza-Concha. 2016. Ultrasound-assisted extraction of phenolics compounds from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and their antioxidant activity. *Agrociencia* 50: 403-412.
- Cumby, N., Y. Zhong, M. Nacz, and F. Shahidi. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.* 109: 144-148.
- Day, L. 2013. Proteins from land plants-potential resources for human nutrition and food security. *Trend. Food Sci. Technol.* 32: 25-42.
- Doucet, D., D. E. Otter, S. F. Gauthier, and E. A. Foegeding. 2003. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6300-6308.
- Elias, R. J., S. S. Kellerby, and E. A. Decker. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48: 430-441.
- Figuroa, O. A., J. É. Zapata, and G. A. Gutiérrez. 2013. Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista EIA* 9:71-84.

—End of the English version—



- Galicia-Flores, L., Y. Salinas-Moreno, B. Espinoza-García, y C. Sánchez-Feria. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Nacional e importada. Rev. Chapingo. Ser. Hort. 14: 121-129.
- Girgih, A. T., R. He, F. M. Hasan, C. C. Udenigwe, T. A. Gill, and R. E. Aluko. 2015. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. Food Chem. 173: 652-659.
- Hamada, J. 2000. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. J. Food Sci. 65: 305-310.
- Ixtaina, V. Y., A. Vega, S. M. Nolasco, M. C. Tomas, M. Gimeno, E. Barzana, and A. Tecante. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. J. Supercrit. Fluids 55: 192-199.
- Ixtaina, V. Y., M. L. Martinez, V. Spotorno, C. V. Mateo, D. M. Maestri, B. W. K. Diehl, S. M. Nolasco, and M. C. Tomas. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. J. Food Compos. Anal. 24: 166-174.
- Karamác, M., A. Kosinska C., and A. Kulczyk. 2016. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. Int. J. Mol. Sci. 17: 13.
- Kong, X., H. Zhou, and H. Qian. 2007. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. Food Chem. 102: 759-763.
- Li, G. H., G. W. Le, H. Liu, and Y. H. Shi. 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. Food Sci. Technol. Int. 11: 281-287.
- Li, Y., Jiang, B., T. Zhang, W. Mu, and J. Liu. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chem. 106: 444-450.
- López B., L., J. A. Gutierrez-Urbe and S. O. Serna-Saldivar. 2014. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. J. Food Sci. 79: R273-R283.
- Malaguti, M., G. Dinelli, E. Leoncini, V. Bregola, S. Bosi, A. F. G. Cicero, and S. Hrelia. 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. Int. J. Mol. Sci. 15: 21120-21135.
- Marineli, R. D., E. A. Moraes, S. A. Lenquiste, A. T. Godoy, M. N. Eberlin, and M. R. Marostica. 2014. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). LWT-Food Sci. Technol. 59:1304-1310.
- Marrufo-Estrada, D. M., M. R. Segura-Campos, L. A. Chel-Guerrero, and D. A. Betancur-Ancona. 2013. Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. Food Chem. 138: 77-83.
- Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agric. Food Chem. 50: 3444-3452.
- Megias, C., J. Pedroche, M. N. Yust, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millán, and J. Vioque. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. LWT-Food Sci. Technol. 41: 1973-1977.
- Megias, C., M. D. Yust, J. Pedroche, H. Lquari, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millán, and J. Vioque. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. J. Agric. Food Chem. 52: 1928-1932.
- Mulero, C. J., R. P. Zafrilla, M. A. Martínez-Cachá, H. M. Leal, and A. J. Abellán. 2011. Péptidos bioactivos. Clin Invest. Arterioscl. 23: 219-227.
- Márquez, M. C., and M. A. Vázquez. 1999. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. Proc. Biochem. 35: 111-117.
- Nielsen, P. M., D. Petersen, and C. Dambmann. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J. Food Sci. 66: 642-646.
- Pedroche, J., M. M. Yust, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millán, and J. Vioque. 2002. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. J. Sci. Food Agric. 82: 960-965.
- Ragaei, S., E. M. Abdel-Aal, and M. Noaman. 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. Food Chem. 98: 32-38.
- Reyes C., E., A. Tecante, and M. A. Valdivia-López. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chem. 107: 656-663.
- Rojas B., D., y C. E. Narváez C. 2009. Determinación de Vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium Guajava* L.) cultivadas en Colombia. Quim. Nova 32: 2336-2340.
- Ruiz R, J., G. Davila O, L. Chel G., and D. Betancur A. 2013. Angiotensin i-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. J. Food Biochem. 37: 26-35.
- Saito, K., D. H. Jin, T. Ogawa, K. Muramoto, E. Hatakeyama, T. Yasuhara, and K. Nokihara. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. J. Agric. Food Chem. 51: 3668-3674.
- Samaranayaka, A. G. P., and E. C. Y. Li-Chan. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J. Funct. Foods 3: 229-254.
- Sarmadi, B. H., and A. Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides 31: 1949-1956.
- SAS, S. and Guide, S. U. S. 2003. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Saura-Calixto, F., and I. Goñi. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. Food Chem. 94: 442-447.
- Segura C., M. R., F. Peralta G., L. Chel G., and D. Betancur A. 2013a. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of chia (*Salvia hispanica*) produced by enzymatic hydrolysis. Int. J. Food Sci. 2013; 1-8.
- Segura-Campos, M. R., I. M. Salazar-Vega, L. A. Chel-Guerrero, and D. A. Betancur-Ancona. 2013b. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) Protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. Food Sci. Technol. 50: 723-731.
- Sánchez S., A., J. Arias M., W. Torres A., E. Marquez R., J. Cárdenas L., G. García S., and J. Ezquerro B. 2014. Caracterización de hidrolizados de desechos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenidos por autohidrólisis y un proceso químico-enzimático. J. Food 12: 85-96.

- Taga, M. S., E. E. Miller, and D. E. Pratt. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61: 928-931.
- Tang, C. H., X. S. Wang, and X. Q. Yang. 2009. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* 114: 1484-1490.
- Torruco U., J. G., L. Chel G., A. Martinez A., G. Davila O., and D. Betancur A. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Sci. Technol.* 42: 1597-1604.
- Torruco U., J. G., M. A. Dominguez M., G. Davila O., A. Martinez A., L. A. Chel G., and D. A. Betancur A. 2008. Péptidos Antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: Una Revisión. Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6: 158-168.
- Tosco, G. 2004. Los beneficios de la chía en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. *Actualidades Ornitol.* 35 p.
- Valdez O., A., C. I. Fuentes G., L. J. Germán B., R. Gutiérrez D., and S. Medina G. 2012. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (*Sulphur yellow*) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *Food Sci. Technol.* 46: 91-96.
- Vastag, Z., L. Popovic, S. Popovic, V. Krimer, and D. Pericin. 2011. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chem.* 124: 1316-1321.
- Vázquez-Ovando, A., D. Betancur-Ancona, and L. Chel-Guerrero. 2013. Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J. Food* 11: 75-80.
- Vazquez-Ovando, J. A., J. G. Rosado-Rubio, L. A. Chel-Guerrero, and D. A. Betancur-Ancona. 2010. Dry processing of chia (*Salvia hispanica* L.) Flour: chemical characterization of fiber and protein. *J. Food* 8: 117-127.
- Vázquez-Ovando, A., G. Rosado-Rubio, L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona. 2009. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci. Technol.* 42: 168-173.
- Villanueva, A., J. Vioque, R. Sanchez-Vioque, A. Clemente, J. Bautista, and F. Millan. 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas Aceites* 50: 472-476.
- Vioque, J., A. Clemente, J. Pedroche, M. D. Yust, and F. Millán. 2001. Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas Aceites* 52: 132-136.
- Xie, Z. J., J. R. Huang, X. M. Xu, and Z. Y. Jin. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111: 370-376.
- Yang, Y. J., E. D. Marczak, M. Yokoo, H. Usui, and M. Yoshikawa. 2003. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4897-4902.
- Yust, M. D., M. D. Millan-Linares, J. M. Alcaide-Hidalgo, F. Millan, and J. Pedroche. 2012. Hypcholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* 92: 1994-2001.
- Yust, M. M., J. Pedroche, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millan, and J. Vioque. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.* 81: 363-369.
- Zhang T., Y. Li, M. Miao, and B. Jiang. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chem.* 128: 28-33.
- Zhang, L., J. Li, and K. Zhou. 2010. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresour. Technol.* 101: 2084-2089.
- Zhuang, H., N. Tang, and Y. Yuan. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *J. Funct. Foods* 5: 1810-1821.