

Evaluation of the biological activity of hydrolysates proteins of *Vicia faba*

Estudio de la actividad biológica de hidrolizados proteicos de *Vicia faba*

León-Espinosa, Erika Berenice¹; Jiménez-Martínez, Cristian²; Cruz-Monterrosa, Rosy Gabriela¹; Rayas-Amor, Adolfo Armando¹; Jiménez-Guzmán, Judith¹; Díaz-Ramírez, Mayra¹; Fabela-Morón, Miriam Fabiola¹; Dávila-Ortiz, Gloria^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma. Departamento de Ciencias de la Alimentación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Av. Hidalgo Poniente 46. Col. La estación, Lerma de Villada, Estado de México. CP. 52006. ²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Campus Zacatenco, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa S/N, C.P.07738. Delegación Gustavo A. Madero, CDMX, México.

*Autor de correspondencia: gdavilao@yahoo.com

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antioxidant and quelating activity of *Vicia faba* protein hydrolysates.

Design/methodology/approach: Bean seeds of the San Pedro Tlaltizapan variety, purchased from the Institute of Agricultural, Aquaculture and Forestry Research of the State of Mexico (ICAMEX) were used. A protein substrate was prepared for enzymatic hydrolysis by alkaline extraction of the protein, followed by isoelectric precipitation from the defatted flour, the concentrate obtained was named protein concentrate (CP). Subsequently, enzymatic hydrolysis of the CP was carried out with a sequential pepsin-pancreatin system and the grade of hydrolysis (GH) was determined. Finally, the antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates was determined.

Results: The defatted bean flour presented 18.6 g of protein/100 g sample. While the concentrate obtained with this flour presented 62.7 g of protein/100 g of sample. The protein increase in the concentrate was 3.4 times showing a significant difference ($p < 0.05$) with the defatted bean flour. The total hydrolysis time was 90 min (45 min for each enzyme in the case of the sequential system). The highest GH obtained with the sequential system was 16% at 45 min. On the other hand, the chelation percentage of these hydrolysates was less than 25%.

Limitations on study/implications: The protein concentrate of *Vicia faba* was not free of phenolic compounds, so this would be a limitation in the GH and consequently in the chelating and antioxidant activity.

Findings/conclusions: The protein hydrolysates of *Vicia faba* obtained through the sequential pepsin-pancreatin system present good antioxidant activity by the various methods studied, showing that when pancreatin is added to the system, these activities improve, since hydrolysates are active, they could be used as functional ingredients in food products.

Keywords: *Vicia faba*, hydrolyzed, pepsin, chelator, antioxidant.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de *Vicia faba*.

Diseño/metodología/aproximación: Se utilizaron semillas de haba de la variedad San Pedro Tlaltizapán, adquiridas en el Instituto de Investigación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). Se preparó un sustrato proteínico para la hidrólisis enzimática por extracción alcalina de la proteína, seguida de precipitación isoeléctrica a partir de la harina desengrasada, el concentrado obtenido se denominó concentrado proteico (CP). Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del CP con un sistema secuencial pepsina-pancreatina y se determinó el grado de hidrólisis (GH). Finalmente se determinó la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos.

Agroproductividad: Vol. 13, Núm. 7, julio. 2020. pp: 81-86.

Recibido: noviembre, 2019. **Aceptado:** junio, 2020.



Resultados: La harina de haba desengrasada presentó 18.6 g de proteína/100g muestra. Mientras que, el concentrado obtenido con esta harina presentó 62.7 g de proteína/100 g de muestra. El aumento de proteína en el concentrado fue de 3.4 veces mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) con la harina de haba desengrasada. El tiempo total de hidrólisis fue de 90 min (45 min para cada enzima en el caso del sistema secuencial). El mayor GH que se obtuvo con el sistema secuencial fue de 16% a los 45 min. Por otra parte, el porcentaje de quelación de estos hidrolizados fue menor al 25%.

Limitaciones del estudio/implicaciones: El concentrado proteico de *Vicia faba*, no estaba libre de compuestos fenólicos, lo que es una limitante en el GH y consecuentemente en la actividad quelante y antioxidante.

Hallazgos/conclusiones: Los hidrolizados proteicos de *Vicia faba* obtenidos a través del sistema secuencial pepsina-pancreatina presentaron actividad antioxidante por los diversos métodos estudiados, mostrando que, al adicionar pancreatina al sistema, estas actividades mejoran, por tanto, los hidrolizados podrían ser utilizados como ingredientes funcionales en productos alimenticios.

Palabras clave: *Vicia faba*, hidrolizados, pepsina, quelante, antioxidante.

promover la salud de las personas, mediante el aumento de la carga antioxidante en el cuerpo. En años recientes el interés de utilizar antioxidantes naturales se ha incrementado sustancialmente (Shahidi *et al.*, 2006), buscando evaluar además el potencial antioxidante de péptidos biológicamente activos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas y mediante el uso de enzimas proteolíticas (Zhu *et al.*, 2006). Los péptidos antioxidantes se pueden obtener y purificar a partir de distintos hidrolizados de proteínas de fuentes como pescado, soya, salvado de arroz y leche, entre otras (Kou *et al.*, 2013). Se han descrito propiedades antioxidantes en las que se incluyen su capacidad de inactivar especies reactivas de oxígeno, eliminar RL, o quelar metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} que pueden incrementar la biodisponibilidad de elementos traza esenciales como calcio y zinc (Gallegos-Tintoré *et al.*, 2011). Por tal motivo se evaluó la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de *Vicia faba*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizaron semillas de haba de la variedad San Pedro Tlaltzapán, adquiridas en el Instituto de Investigación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), del ciclo 2012, mismas que fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Obtención del concentrado proteico (CP) con polifenoles

Se preparó un sustrato proteínico para la hidrólisis enzimática por extracción alcalina de la proteína, seguida de precipitación isoeléctrica a partir de la harina desengrasada, denominado concentrado proteico (CP) con polifenoles. Para ello, la

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo, que surge como resultado de un desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y defensas antioxidantes, se asocia con el daño a una amplia gama de especies moleculares que incluyen lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Se ha demostrado que contribuye significativamente a enfermedades inflamatorias, isquémicas, Alzheimer, Parkinson, enfermedades relacionadas al tabaquismo (Lobo *et al.*, 2010) y con algunas otras condiciones incluyendo la aterosclerosis, inflamación, ciertos tipos de cáncer y el proceso de envejecimiento. Bajo este contexto, la orientación de las vías patológicas comunes ha ganado una atención creciente para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. Si bien en el área farmacéutica existen medicamentos antioxidantes, ninguno de éstos es libre de efectos secundarios. Dada las preocupaciones sobre los efectos secundarios del uso prolongado de compuestos sintéticos, existe un creciente interés en las aplicaciones terapéuticas y sus derivados como alternativas más seguras, ya sea como alimentos funcionales o nutraceuticos (Chakrabarti *et al.*, 2014). Las proteínas alimentarias de origen vegetal y animal se han utilizado para obtener una amplia gama de péptidos bioactivos (Granato *et al.*, 2017), que son generalmente péptidos cortos (3 a 20 aminoácidos) derivados de proteínas que pueden ejercer actividades biológicas por encima de su valor nutricional esperado (Alashi *et al.*, 2014). Entre las proteínas alimentarias precursoras de péptidos destacan las proteínas lácteas, tanto de la caseína, como del suero que muestran actividad antihipertensiva, opioide, antimicrobiana e inmunomoduladora (Dziuba *et al.*, 2004; Darewicz *et al.*, 2007). Las proteínas de la carne de pollo y huevo son importantes fuentes de biopéptidos con actividad antihipertensiva (Pihlanto *et al.*, 2008). Por otra parte, el uso de antioxidantes en la dieta ha sido reconocido como potencialmente eficaz para

harina correspondiente se suspendió en agua en una proporción 1:10 (p/v), se ajustó al pH de solubilización (pH 10.5) y se mantuvo constante a través de la adición de NaOH 1 N para la extracción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. El extracto se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min, el sobrenadante recuperado de esta etapa se llevó al pH de precipitación isoelectrica (4) ajustando con NaOH 1 N o HCl 1 N y manteniendo en agitación durante 1 h, seguido de centrifugación a 10,000 rpm durante 30 min. Los concentrados fueron liofilizados a $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.488 mbar para su posterior análisis.

Hidrólisis enzimática

Para el sistema enzimático secuencial se partió de un volumen de 100 mL de una suspensión de concentrado proteico preparada al 5% de proteína con una relación enzima/sustrato 1/10 (p/p), la temperatura se mantuvo estable a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pH constante a 2 cuando se adicionó pepsina y 7.5 con pancreatina. Los tiempos de hidrólisis fueron los mismos, sin embargo, cada enzima se dejó actuar por la mitad del tiempo establecido. En todos los casos, la hidrólisis se detuvo por calentamiento en baño a ebullición durante 5 min. Así mismo, la proteína soluble se almacenó para la evaluación de la actividad antioxidante.

Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH), se determinó con el método de Kim *et al.* (1990). Este se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble, después de agregar ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión del concentrado proteico. Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomaron 5 mL de cada hidrolizado proteico y se mezclaron con 5 mL de TCA al 10%. Esta mezcla se centrifugó a 10000 rpm/15 min y se determinó el N del sobrenadante por el método de Kjeldahl (Horwitz, 2015). El N total se determinó a la suspensión de proteína sin hidrolizar.

Evaluación del poder reductor

El poder reductor de los hidrolizados y fracciones se determinó de acuerdo con Oyaizu (1986). A $20\text{ }\mu\text{L}$ de hidrolizado y fracciones (0.1mg/mL de proteína) o de butilhidroxitolueno (BHT), se les adicionó $50\text{ }\mu\text{L}$ del regulador de fosfato 0.2 M, pH 6.6 y $50\text{ }\mu\text{L}$ de ferricianuro de potasio 1% en una placa de 96 pozos. Se incubó a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min y posteriormente se adicionaron $50\text{ }\mu\text{L}$ de TCA al 10% y $10\text{ }\mu\text{L}$ de FeCl_3 0.1%, se mantuvo en incubación

nuevamente por 10 min/ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se leyó la absorbancia a 700 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems).

Evaluación de la actividad quelante de cobre

La actividad quelante del Cu^{2+} se determinó de acuerdo con Saiga *et al.* (2003). Veinte μL de muestra (hidrolizados 0.1 mg/mL) se mezclaron con $290\text{ }\mu\text{L}$ del regulador de acetatos (pH 6.50 mM), $6\text{ }\mu\text{L}$ de pirocatecol violeta (4 mM) preparado en el mismo regulador y $10\text{ }\mu\text{g}$ de cobre. El cambio en la solución fue medido a 632 nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems).

Evaluación de la actividad quelante de hierro

La actividad quelante de Fe^{2+} se determinó con la formación del complejo Fe^{2+} ferrocina de acuerdo con Carter (1971). Los hidrolizados se mezclaron con $250\text{ }\mu\text{L}$ del regulador de acetato de sodio 100 mM pH 4.9 y $30\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de FeCl_2 (0.1 mg/mL en agua) y puestas a incubación durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron $12.5\text{ }\mu\text{L}$ de ferrozina 40 mM. La unión de los iones Fe^{2+} con la ferrozina generó un complejo colorido que fue medido a 562 nm en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con Análisis de Varianza bifactorial y trifactorial. La comparación de medias se realizó con la prueba de Student Newman Keuls (SNK) a una significancia de 0.05%. Se utilizó el programa estadístico SPSS Ver. 21 (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del concentrado proteico

La harina de haba desengrasada presentó 18.6 g de proteína/100 g muestra. Mientras que el concentrado obtenido con esta harina presentó 62.7 g de proteína/100 g de muestra. El aumento de proteína en el concentrado fue de 3.4 veces, mostrando diferencia significativa con la harina de haba desengrasada. Macarulla *et al.* (2007) reportó 77.3 g de proteína/100 g para el concentrado proteico de haba. El contenido de proteína en la harina fue similar a la reportada por Vioque *et al.* (2012) quienes obtuvieron 26.6 g de proteína/100 g, mientras que el concentrado 92 g de proteína/100 g, valor superior al aquí obtenido. Estos contenidos, pueden modificarse, ya que influye el método de obtención del concentrado, la variedad o cultivar de haba, el nivel de maduración de

la misma, así como las condiciones climatológicas y zona de cultivar (Osman *et al.*, 2014).

Sánchez y Vázquez (2017) indicaron que la modificación enzimática también puede generar compuestos con actividad biológica como los péptidos, que tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos en el organismo. Por lo anterior, los concentrados proteicos de haba, podrían ser una alternativa viable para la obtención de péptidos con actividad biológica como la antioxidante.

Hidrólisis enzimática

El grado de hidrólisis (GH) obtenido con el sistema secuencial (pepsina-pancreatina), mostró que el tiempo total de hidrólisis fue de 90 min (45 min para cada enzima en el caso del sistema secuencial). El mayor GH que se obtuvo con el sistema secuencial fue de 16% a los 45 min (Figura 1). Los resultados sugieren que el uso de ambas enzimas para la hidrólisis proteica es más efectivo que utilizando un sistema individual, probablemente porque la pre-digestión con pepsina incrementó el número de sitios C-terminales que facilitaron la hidrólisis con pancreatina. En comparación con otras leguminosas como *Cicer arietinum*, en los que se han reportado valores cercanos al 54.73% de GH después de 3 h de hidrólisis, usando un sistema enzimático secuencial alcalasa-flavoenzima (Kou *et al.*, 2013). El sistema

secuencial pepsina pancreatina, hidroliza preferentemente los enlaces C-terminales de los residuos de Fen, Trp, Tir, Met y Leu (Arihara *et al.*, 2001).

Si bien, el sistema enzimático empleado presentó actividad catalítica sobre el concentrado proteico de haba ya que se obtuvieron hidrolizados de tipo extensivo, es decir con un GH mayor al 10%. De acuerdo con Benitez *et al.* (2008) la hidrólisis de tipo extensivo genera péptidos con actividad biológica, los cuales tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos.

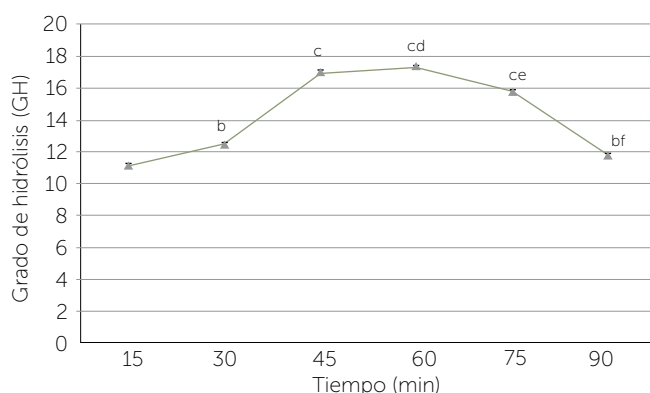


Figura 1. Grado de hidrólisis (%) del concentrado proteico (CP) producido por tratamiento con un sistema secuencial. Los resultados representan las medias de tres determinaciones independientes \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa. ANOVA bifactorial, comparación de grupos por SNK ($p \leq 0.05$).

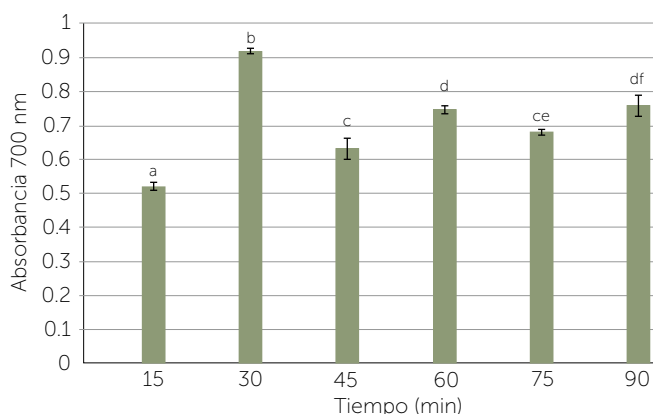


Figura 2. Poder reductor como medida de la capacidad antioxidante de los hidrolizados de haba obtenidos del contenido proteico (CP). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa. ANOVA bifactorial, comparación de grupos por SNK ($p \leq 0.05$).

Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados proteicos Poder reductor

Durante la hidrólisis enzimática, se generan una variedad de péptidos pequeños y aminoácidos libres, dependiendo de la especificidad de la enzima (Peng *et al.*, 2010). La actividad antioxidante puede verse afectada por los cambios en el tamaño del péptido y en la composición de aminoácidos (Sánchez y Vázquez, 2017). El poder reductor de los hidrolizados obtenidos de CP fue determinado como la habilidad de reducir el complejo Fe^{3+} /ferricianida a su forma ferrosa, originando el $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, denominado azul de Prusia, lo cual indica la capacidad que tienen los hidrolizados para actuar como antioxidantes, mediante la donación de electrones (Li *et al.*, 2008).

Los resultados indican que los péptidos obtenidos mostraron capacidad para donar electrones y transformar a los RL en sustancias más estables que permiten interrumpir la reacción en cadena (Juntachote y Berghofer, 2005). Kou *et al.* (2013) reportó en fracciones proteicas de *Cicer arietinum* obtenidas con alcalasa, valores de $Abs_{700nm} = 0.247$ a una concentración de 0.5 mg/mL. Así mismo, Li *et al.* (2008) reportó una absorbancia de 0.35 en fracciones proteicas de *Cicer arietinum* obtenidas con el sistema secuencial alcalasa-flavoenzima por 90 min.

Evaluación de la actividad quelante de cobre

La quelación de metales mide el grado de protección contra las reacciones de oxidación, que son catalizadas por metales de transición como el Cu^{2+} y el Fe^{+2} (Saiga et al., 2003) y que pueden catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$) (Torres-Fuentes et al., 2015). Estas reacciones de oxidación *in vivo* están aparentemente involucradas en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Mandel et al., 2006).

En la Figura 3 se muestran los valores de la quelación de Cu^{2+} obtenidos de los hidrolizados proteicos. Se observó que, a partir del CP, la mayor quelación de este metal se obtuvo en el hidrolizado obtenido con pepsina, presentando valores entre 26.76-65.48%, alcanzando el máximo a los 45 min. Se ha demostrado que los péptidos quelantes de cobre, por ser ricos en His, previenen la actividad oxidativa de este metal. El anillo imidazol de este residuo está directamente implicado en la unión con el cobre. Por otra parte, también se ha observado que estos péptidos son ricos en Arg y aunque este aminoácido carece de propiedades quelantes, puede favorecer la unión del péptido con el ion metálico (Megías et al., 2008).

Evaluación de la actividad quelante de hierro

La actividad quelante de hierro en los hidrolizados proteicos obtenidos a partir del CP se muestran la Figura 4. En los hidrolizados obtenidos a partir de CP, se presentó un alto porcentaje de quelación con valores que van de 76.74 a 95.73%. Gallegos-Tintoré et al. (2011) reportaron una actividad de 60% en hidrolizados proteicos de *Jatropha curcas* con alcalasa, en donde la actividad incrementó conforme al tiempo de hidrólisis, alcanzando la máxima actividad a los 50 min. La quelación de este metal parece ser al menos responsable parcialmente de la actividad antioxidante que se ha encontrado en varios aminoácidos, incluyendo Tyr, Met, His, Lys, Arg, y Trp (Huang et al., 2010). Además, la quelación de hierro por His, Glu, Asp, y Cys muestra resultados en la absorción de hierro y también puede dar lugar a la reducción de férrico a ión ferroso (Storcksdieck et al., 2007).

CONCLUSIONES

El sistema secuencial pepsina-pancreatina presentó actividad catalítica en el concentrado proteico de *Vicia faba*, se obtuvieron hidrolizados de tipo extensivo, es decir con un GH mayor al 10%, lo que permite que éstos se

puedan utilizar como una fuente de péptidos bioactivos con actividad biológica. Por otra parte, se observó que la hidrólisis enzimática favorece la liberación de péptidos con actividad de atrapar a los iones Fe^{2+} y Cu^{2+} , por lo que este hecho podría beneficiar en detener las reacciones en cadena de los RL, ya que estos iones participan en el proceso de generación de especies oxidantes.

LITERATURA CITADA

- Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500-506. Doi: 10.1016/2013.09.081
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57(3), 319-324. Doi: 10.1016/S0309-1740(00)00108-X

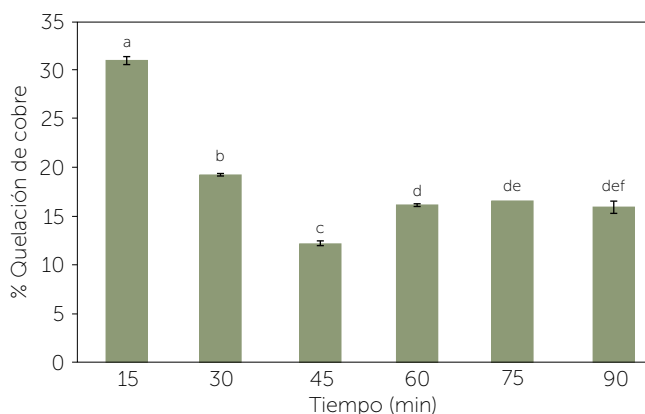


Figura 3. Actividad quelante de cobre de los hidrolizados proteicos de haba provenientes del concentrado proteico (CP). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa. ANOVA trifactorial, comparación de grupos por SNK ($p \leq 0.05$).

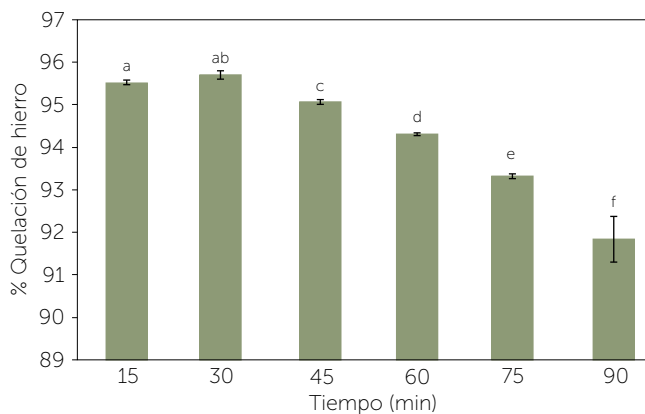


Figura 4. Actividad quelante de hierro de los hidrolizados proteicos de haba provenientes del concentrado proteico (CP). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa. ANOVA trifactorial, comparación de grupos por SNK ($p \leq 0.05$).

- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40(2), 450-458. Doi: 10.1016/0003-2697(71)90405-2
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014, 608979. Doi: 10.1155/2014/608979
- Darewicz, M., Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (2007). Computational Characterisation and Identification of Peptides for in silico Detection of Potentially Celiac-Toxic Proteins. *Food Science and Technology International*, 13(2), 125-133. Doi: 10.1177/1082013207077954
- Dziuba, J., Niklewicz, M., Iwaniak, A., Darewicz, M., & Minkiewicz, P. (2004). Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins. *Acta Alimentaria*, 33(3), 227-235. Doi: 10.1556/AAlim.33.2004.3.3
- Gallegos-Tintoré, S., Torres-Fuentes, C., Martínez-Ayala, A. L., Solorza-Feria, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., & Vioque, J. (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1618-1624. Doi: 10.1002/jsfa.4357
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22. Doi: 10.1016/j.tifs.2016.12.010
- Horwitz, W. (2010). Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.
- Huang, W.-Y., Majumder, K., & Wu, J. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123(3), 635-641. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.083
- Juntachote, T., & Berghofer, E. (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, 92(2), 193-202. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.04.044
- Kim, S. Y., Park, P. S. W., & Rhee, K. C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 651-656. Doi: 10.1021/jf00093a014
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 591-598. Doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.002
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444-450. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.067
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010, July). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126. Doi: 10.4103/0973-7847.70902
- Macarulla, M. T., Medina, C., Diego, M. A. De, Chávarri, M., Zulet, M. Á., Martínez, J. A., & Portillo, M. P. (2007). Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 85(05), 607. Doi: 10.1079/BJN2000330
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., & Youdim, M. B. H. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(2), 229-234. Doi: 10.1002/mnfr.200500156
- Megjás, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977. Doi: 10.1016/j.lwt.2007.11.010
- Osman, A. M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A. M., Mohammed, N., Rushdi, M. A. H., Diab, E. E., & Babiker, E. E. (2014). Effects of gamma irradiation and/or cooking on nutritional quality of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1554-1560. Doi: 10.1007/s13197-012-0662-7.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. Doi: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307
- Peng, X., Kong, B., Xia, X., & Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with alcalase. *International Dairy Journal*, 20(5), 360-365. Doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.019
- Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. J. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109(1), 104-112. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.023
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661-3667. Doi: 10.1021/jf021156g
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46. Doi: 10.1093/fqsafe/fyx006
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M., & Wall, D. S. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99(3), 478-483. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.009
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G., & Hurrell, R. F. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from *in vitro* digestion of different meat sources. *Journal of Food Science*, 72(1), S019-29. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00229.x
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. del M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.046
- Vioque, J., Alaiz, M., & Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, 132(1), 67-72. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.033
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302. Doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.029