

# Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hydrolysates obtained from lupin and faba bean proteins via enzymatic hydrolysis and fermentation

## Actividades antioxidante e inhibitoria de la ECA de hidrolizados obtenidos a partir de proteínas de lupino y haba mediante hidrólisis enzimática y fermentación

Blanca Elizabeth Hernández-Rodríguez<sup>1</sup>; Eleazar Aguirre-Mandujano<sup>1\*</sup>; Arely Prado-Barragán<sup>2</sup>; Guillermo Ismael Koh-Kantún<sup>1</sup>; Consuelo Lobato-Calleros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Ciudad de México, C. P. 09340, MÉXICO.

\*Corresponding author: [eleagman@yahoo.com](mailto:eleagman@yahoo.com), tel. (595) 95 70572.

### Abstract

**Introduction:** Legumes and pseudocereals protein hydrolysates have been recognized as having improved potential health-promoting properties as compared with native proteins.

**Objectives:** 1) Produce bioactive hydrolysates from lupin and faba bean proteins by enzymatic hydrolysis (EH) and solid-state fermentation (SF), 2) compare the angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activities of the hydrolysates and 3) evaluate the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant and antihypertensive activities of the hydrolysates.

**Methodology:** Hydrolysates from proteins of faba bean (*Vicia faba*) and lupin (*Lupinus gredensis*) were obtained by EH using Flavourzyme and SF by *Aspergillus niger*. The antioxidant and ACE-inhibitory activities of the hydrolysates were assessed.

**Results:** All the hydrolysates presented DPPH radical scavenging activity, with IC<sub>50</sub> ranging from 1.23-2.08 mg<sub>protein</sub>·mL<sup>-1</sup>. Only EH and SF hydrolysates obtained from lupin proteins had ACE-inhibitory activity (IC<sub>50</sub>: 2.39 and 14.08 mg<sub>protein</sub>·mL<sup>-1</sup>, respectively). Radical scavenging activity hydrolysates was significantly reduced after *in vitro* gastrointestinal digestion, while ACE-inhibitory activity showed variable behavior.

**Study limitations:** Specific molecules responsible for the *in vitro* health-promoting properties should be identified.

**Originality:** Relevant information is provided on health-promoting attributes of faba bean and lupin hydrolysates obtained by EH and SF.

**Conclusions:** EH and SF improved the health-promoting properties of faba bean and lupin native proteins.

### Resumen

**Introducción:** Se ha reconocido que los hidrolizados de proteínas de leguminosas y pseudocereales tienen mejores propiedades potenciales para la salud en comparación con las proteínas nativas.

**Objetivos:** 1) Producir hidrolizados bioactivos a partir de proteínas de lupino y haba mediante hidrólisis enzimática (HE) y fermentación en estado sólido (FS), 2) comparar las actividades inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y antioxidante de los hidrolizados y 3) evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre las actividades antioxidante y antihipertensiva de los hidrolizados.

**Metodología:** Se obtuvieron hidrolizados de proteínas de haba (*Vicia faba*) y lupino (*Lupinus gredensis*) mediante HE utilizando Flavourzyme y FS mediante *Aspergillus niger*. Se evaluaron las actividades antioxidante e inhibitoria de la ECA de los hidrolizados.

**Resultados:** Los hidrolizados presentaron actividad de captación de radicales DPPH, con una CI<sub>50</sub> que osciló entre 1.23 y 2.08 mg<sub>proteína</sub>·mL<sup>-1</sup>. Únicamente los hidrolizados HE y FS obtenidos de las proteínas de lupino tuvieron respuesta inhibitoria de la ECA (CI<sub>50</sub>: 2.39 y 14.08 mg<sub>proteína</sub>·mL<sup>-1</sup>, respectivamente). La captación de radicales de los hidrolizados se redujo significativamente después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, mientras que su actividad inhibitoria de la ECA mostró un comportamiento variable.

**Limitaciones del estudio:** Las moléculas específicas responsables de las propiedades promotoras de la salud *in vitro* deberían ser identificadas.

**Originalidad:** Se brinda información relevante sobre los atributos promotores de la salud de los hidrolizados de haba y lupino obtenidos por HE y FS.

**Conclusiones:** HE y FS mejoraron las propiedades promotoras de la salud de proteínas nativas de haba y lupino.

**Keywords:** faba bean, *Lupinus gredensis*, protein hydrolysates, flavourzyme, solid-state fermentation.

**Palabras clave:** haba, *Lupinus gredensis*, hidrolizados proteínicos, Flavourzyme, fermentación en estado sólido.



## Introduction

Lower risk and occurrence of chronic diseases have been correlated with whole grains of cereals, legumes and pseudocereals regular intake (Ayyash et al., 2019; Malaguti et al., 2014). Therefore, there is a need to understand the attributes of legumes and to obtain specific components with functional properties without extensive processing (Barbana & Boye, 2010). Protein derived hydrolysates may represent one such source of health-enhancing components.

Recently, bioactivity of protein hydrolysates has been reported, including antihypertensive, antioxidant, immunomodulatory, opioid and hypercholesterolemic activities (Aluko, 2019; Ayyash, Johnson, Liu, Al-Mheiri, & Abushelaibi, 2018; Lammi, Aiello, Boschini, & Arnoldi, 2019).

Several research studies have shown that enzymatic hydrolysates contain bioactive peptides, which are small amino acids sequences released from native proteins (NP) by hydrolysis. Protein hydrolysates from soy, lentil, bean, chickpea, and pea have received much attention (Hernández-Álvarez et al., 2013; Roy, Boye, & Simpson, 2010). In contrast, there are very scarce studies about protein hydrolysates from lupin (*Lupinus gredensis*), which has a protein content comparable to that of soybean (Ayyash et al., 2019; Vioque, Alaiz, & Girón-Calle, 2012).

Karkouch et al. (2017) identified peptides with antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities released from faba bean seed protein by trypsin, which could be potentially used in cosmetic and pharmaceutical industries. Jakubczyk et al. (2019) inform that the conditions of the faba bean seed fermentation process have an influence on the molecular mass of proteins and activities of peptides released from the protein during *in vitro* digestion.

Protein hydrolysates are mostly produced by *in vitro* enzymatic hydrolysis (EH) using food-grade enzyme preparations or by fermentation using microorganisms as a source of proteolytic enzymes (Chibuike & Aluko, 2012). The latter process is a simpler and more economical means of obtaining protein hydrolysates compared to EH (Ferri, Serrazanetti, Tassoni, Baldissarri, & Gianotti, 2016; Marques et al., 2019). Both methods produce protein hydrolysates that differ in structural and functional characteristics (Chibuike & Aluko, 2012), so that it is of the utmost importance to gain understanding about the factors affecting the biological properties of these components.

It is difficult to translate the *in vitro* health-promoting effects of the protein hydrolysates on human as bioactive peptides may be degraded during digestion.

## Introducción

La disminución de riesgo y la aparición de enfermedades crónicas se han correlacionado con la ingesta regular de cereales integrales, leguminosas y pseudocereales (Ayyash et al., 2019; Malaguti et al., 2014). Por ello, existe la necesidad de comprender los atributos de las leguminosas y obtener componentes específicos con propiedades funcionales sin necesidad de un procesamiento extenso (Barbana & Boye, 2010). Los hidrolizados derivados de proteínas pueden representar una fuente de propiedades que mejoran la salud.

Recientemente, se ha reportado la bioactividad de hidrolizados proteínicos, incluidas las actividades antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora, opiácea e hipercolesterolémica (Aluko, 2019; Ayyash, Johnson, Liu, Al-Mheiri, & Abushelaibi, 2018; Lammi, Aiello, Boschini, & Arnoldi, 2019).

Varias investigaciones han demostrado que los hidrolizados enzimáticos contienen péptidos bioactivos, que son pequeñas secuencias de aminoácidos liberados de proteínas nativas (PN) por hidrólisis. Los hidrolizados proteínicos de soya, lenteja, frijol, garbanzo y chícharo han recibido mucha atención (Hernández-Álvarez et al., 2013; Roy, Boye, & Simpson, 2010). Por el contrario, hay muy pocos estudios relacionados con los hidrolizados de proteína de lupino (*Lupinus gredensis*), los cuales tienen un contenido de proteína comparable con el de la soya (Ayyash et al., 2019; Vioque, Alaiz, & Girón-Calle, 2012).

Karkouch et al. (2017) identificaron péptidos con actividades antioxidante, antitirocinasa y antifilmadora de biopelícula liberados a partir de la proteína de semillas de haba por tripsina, que podrían utilizarse potencialmente en las industrias cosmética y farmacéutica. Jakubczyk et al. (2019) mencionan que las condiciones del proceso de fermentación de semillas de haba influyen en la masa molecular de las proteínas y en las actividades de los péptidos liberados de la proteína durante la digestión *in vitro*.

Los hidrolizados proteínicos se producen principalmente por hidrólisis enzimática (HE) *in vitro* utilizando preparados enzimáticos de calidad alimentaria, o por fermentación utilizando microorganismos como fuente de enzimas proteolíticas (Chibuike & Aluko, 2012). Este último proceso es un medio más sencillo y económico para obtener hidrolizados proteínicos en comparación con la HE (Ferri, Serrazanetti, Tassoni, Baldissarri, & Gianotti, 2016; Marques et al., 2019). Ambos métodos producen hidrolizados de proteína que difieren en sus características estructurales y funcionales (Chibuike & Aluko, 2012), por lo que es de suma importancia comprender los factores que afectan las propiedades biológicas de estos componentes.

It is, therefore, important to have information regarding the resistance of the protein hydrolysates to gastrointestinal enzymes (Carbonaro, Maselli, & Nucara, 2015). Based on the above the objectives of this study were to: 1) produce bioactive hydrolysates from lupin and faba bean proteins by EH and solid-state fermentation (SF), 2) compare the angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activities of the hydrolysates, and 3) evaluate the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant and antihypertensive activities of the hydrolysates.

## Materials and methods

### Seeds

Faba bean (F; *Vicia faba*) and lupin (L; *Lupinus gredensis*) seeds were purchased from Empacadora de Semillas Zaragoza, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Flours were obtained by milling seeds in a cutter mill (Pulvex, Mexico), and the fractions that were retained between 0.14 and 1.19 mm sieves were collected. Flours were vacuum packed in polyethylene bags, and stored under dark conditions at 4 °C. Flours were analysed for protein, moisture, ash, crude fiber, and fat (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2005). The remaining percentage was considered to represent carbohydrates.

### Materials

*Aspergillus niger* GH1 strain was obtained from Food Research Department, University of Coahuila (GenBank: HQ450381.1). Flavourzyme® 1000 L (EC 3.4.11.1, a mixture of endoproteinase and exopeptidase of *Aspergillus oryzae*; 1000 LPU·g<sup>-1</sup>) was purchased from Novo Nordisk (Denmark). Potato dextrose agar (PDA) was purchased from DIFCO™ (USA). Tween-80, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), L-leucine, tannic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), hippuric acid (HA), Hammarsten grade casein, pepsin (P7000), pancreatin (P1750), angiotensin converting enzyme (ACE-I, A6778), and Whatman No. 41 filter paper were purchased from Sigma-Aldrich® (USA). Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad® (USA). All other chemicals used in the experiments were of analytical grade, and all the water used was double distilled and deionized (DDW).

### Enzymatic hydrolysis (EH)

Protein extraction from the flours was carried out according to Alshaimy, Sitohy, and El-Masry (2007) with slight modifications. Flour samples (50 g) were suspended in 1 L of DDW. pH was adjusted to 12 with

Es difícil traducir los efectos promotores de la salud *in vitro* de los hidrolizados proteínicos en humanos, ya que los péptidos bioactivos pueden degradarse durante la digestión. Por lo tanto, es importante tener información sobre la resistencia de dichos hidrolizados a las enzimas gastrointestinales (Carbonaro, Maselli, & Nucara, 2015). Considerando todo lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: 1) producir hidrolizados bioactivos a partir de proteínas de lupino y haba mediante HE y fermentación en estado sólido (FS), 2) comparar las actividades inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y antioxidante de los hidrolizados y 3) evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre las actividades antioxidante y antihipertensiva de los hidrolizados.

## Materiales y métodos

### Semillas

Las semillas de haba (F; *Vicia faba*) y lupino (L; *Lupinus gredensis*) se adquirieron en la Empacadora de Semillas Zaragoza, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Las harinas se obtuvieron a partir de la molienda de las semillas en un molino de corte (Pulvex, México), y se colectaron las fracciones retenidas en tamices de entre 0.14 y 1.19 mm. Las harinas se envasaron al vacío en bolsas de polietileno y se almacenaron en condiciones de oscuridad a 4 °C. Las harinas se analizaron para determinar proteína, humedad, ceniza, fibra cruda y grasa (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2005), y se consideró que el porcentaje restante correspondía con los carbohidratos.

### Materiales

La cepa de *Aspergillus niger* GH1 fue proporcionada por el Departamento de Investigación de Alimentos de la Universidad de Coahuila (GenBank: HQ450381.1). Flavourzyme® 1000 L (EC 3.4.11.1, una mezcla de endoproteinasa y exopeptidasa de *Aspergillus oryzae*; 1000 LPU·g<sup>-1</sup>) se adquirió de Novo Nordisk® (Dinamarca), mientras que el agar papa dextrosa (APD) de la marca DIFCO™ (EUA). Tween-80, ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), L-leucina, ácido tánico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL), ácido hipúrico (HA), caseína de grado Hammarsten, pepsina (P7000), pancreatina (P1750), enzima convertidora de angiotensina (ACE-I, A6778) y papel filtro Núm. 41 (Whatman) se compraron a Sigma-Aldrich® (EUA). Los reactivos de electroforesis se obtuvieron de Bio-Rad® (EUA). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico, y el agua utilizada fue doblemente destilada y desionizada (ADD).

6 N and 0.1 N NaOH, and the suspensions were stirred at 100 rpm using an orbital shaker (E-2500, Thermo Fisher®, USA), for 120 min at 25 °C. Afterwards, 1 mL samples were taken and centrifuged at 6000 g for 30 min at 4 °C (X-12R, Allegra®, USA). Soluble protein in the supernatants was determined by the modified Lowry method (Peterson, 1977).

Supernatants were poured into Erlenmeyer flasks, pH was adjusted to 7 using 6 N and 0.1 N HCl, and Flavourzyme® 1000 L in an enzyme to substrate (E/S) ratio of 125 LAPU·g<sub>protein</sub><sup>-1</sup> was added. The Erlenmeyer flasks were continuously stirred (150 rpm, 8 h, 50 °C). Aliquots (250 µL) were withdrawn every 60 min, added with 0.01 g·mL<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulfate, and heated at 85 °C for 15 min to inactivate the enzymes mix. Hydrolysates were centrifuged (10000 g, 30 min, 4 °C) and filtered to remove insoluble residues. The filtrates were used for the determination of degree of hydrolysis (DH percentage) and molecular weight (MW) distribution, freeze-dried (Lyph Lock 6, Labconco, USA) and stored at -20 °C until required for antioxidant and ACE-inhibitory analysis. F and L enzymatic hydrolysates were coded as EH<sub>F</sub> and EH<sub>L</sub>, respectively.

#### Solid-state fermentation (SF) hydrolysis

The fungal strain was cultured for 5 days at 30 °C in Erlenmeyer flask (250 mL) with 50 mL of PDA. Spores were harvested using 10 mL of Tween 80 (0.1 % v/v). SF was carried out by placing 10 g of each flour in 250 mL Erlenmeyer flasks. The moisture content was adjusted at 50 % (w/w) with a salts solution (pH 6) containing (% w/v): dipotassium hydrogen phosphate (0.1), magnesium sulphate (0.005) and potassium chloride (0.005). Flasks were autoclaved at 121 °C for 20 min, cooled to 30 °C, inoculated with 2 × 10<sup>7</sup> spores·g<sup>-1</sup> of dried flours, and incubated at 30 °C. Samples (duplicates) were withdrawn at 24 h intervals during 6 days, added with DDW (1:3), vortexed for 1 min, and heated at 85 °C for 15 min to inactivate the proteases. The insoluble material was removed by centrifugation at 10000 g, for 10 min at 4 °C and filtered. Filtrates were used for the determination of DH percentage and MW distribution analysis, then freeze-dried and stored at -20 °C, until required for analysis. In the case of protease activity determination samples were withdrawn before heating at 85 °C. F and L hydrolysates were coded as SF<sub>F</sub> and SF<sub>L</sub>, respectively.

#### Degree of hydrolysis

DH percentage was calculated by determining free amino groups through reaction with TNBS using a leucine standard (Addler-Nissen, 1979). The total number of amino groups was determined in a 100 % hydrolyzed sample treated with 6 N HCl at 110 °C for 24 h in a vacuum oven (Memmert, USA).

#### Hidrólisis enzimática (HE)

La extracción de proteínas de las harinas se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Alshaimy, Sitohy, y El-Masry (2007), con ligeras modificaciones. Las muestras de harina (50 g) se suspendieron en 1 L de ADD. El pH se ajustó a 12 con NaOH 6 N y 0.1 N, y las suspensiones se mezclaron a 100 rpm en un agitador orbital (E-2500, Thermo Fisher®, EUA), durante 120 min a 25 °C. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 mL y se centrifugaron (X-12R, Allegra®, EUA) a 6000 g durante 30 min a 4 °C. La proteína soluble en los sobrenadantes se determinó por el método Lowry modificado (Peterson, 1977).

Los sobrenadantes se depositaron en matraces Erlenmeyer, se ajustó el pH a 7 con HCl 6 N y 0.1 N, y se agregó Flavourzyme® 1000 L en una relación enzima-sustrato (E/S) de 125 LAPU·g<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>. Los matraces Erlenmeyer se agitaron continuamente (150 rpm, 8 h, 50 °C). Cada 60 min se retiraron alícuotas de 250 µL, se adicionaron con 0.01 g·mL<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sodio y se calentaron a 85 °C durante 15 min para inactivar la mezcla enzimática. Los hidrolizados se centrifugaron (10000 g, 30 min, 4 °C) y se filtraron para eliminar los residuos insolubles. Los filtrados se utilizaron para determinar el grado de hidrólisis (porcentaje de GH) y la distribución de peso molecular (PM). Finalmente, se liofilizaron (Lyph Lock 6, Labconco®, EUA) y se almacenaron a -20 °C hasta que se requirieron para el análisis antioxidante y actividad inhibitoria de ECA. Los hidrolizados enzimáticos F y L se codificaron como HE<sub>F</sub> y HE<sub>L</sub>, respectivamente.

#### Hidrólisis por fermentación en estado sólido (FS)

La cepa fúngica se cultivó durante 5 días a 30 °C en un matraz Erlenmeyer (250 mL) con 50 mL de APD. Las esporas se cosecharon utilizando 10 mL de Tween 80 (0.1 % v/v). La FS se llevó a cabo con 10 g de cada harina colocados en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El contenido de humedad se ajustó al 50 % (p/p) con una solución de sales (pH 6) que contenía (% p/v): fosfato ácido de potasio (0.1), sulfato de magnesio (0.005) y cloruro de potasio (0.005). Los matraces se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min, se enfriaron a 30 °C, se inocularon con 2 × 10<sup>7</sup> esporas·g<sup>-1</sup> de harina seca y se incubaron a 30 °C. Las muestras (por duplicado) se retiraron a intervalos de 24 h durante 6 días, se le añadió ADD (1:3), se agitaron en vórtex durante 1 min y se calentaron a 85 °C durante 15 min para inactivar las proteasas. El material insoluble se removió por centrifugación a 10000 g, durante 10 min a 4 °C, y se filtró. Los filtrados se utilizaron para determinar el porcentaje de GH y el análisis de distribución de PM; posteriormente, se liofilizaron y almacenaron a -20 °C, hasta que se requirieron para análisis. En el caso de la determinación de la actividad de la proteasa,

## Fungal protease activity

The fungal protease activity in the SF hydrolysates was determined according to the method reported by Hernández-Martínez et al. (2011) with slight modifications. Briefly, the reaction mixture consisted of 570  $\mu\text{L}$  of a solution containing Hammerstein grade casein at  $0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in phosphate buffer (50 mM, pH 7) pre-incubated at  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min and 30  $\mu\text{L}$  of SF hydrolysate. The enzymatic reaction was performed during 15 min and stopped by adding 0.9 mL of trichloroacetic acid (TCA;  $0.050 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The mixture was centrifuged at 10000 g for 15 min at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , and filtered. Soluble peptides in TCA were estimated by the modified Lowry method. One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme required to produce an increment of 0.01 in absorbance at 750 nm under the assay conditions (Soares-de Castro & Sato, 2014). Enzyme activity was expressed in U-per gram of dry matter ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Castañeda-Casasola et al., 2018).

## Electrophoresis

MW distribution of the NP and their hydrolysates was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli (1970) using a Mini-Protean 2 gel electrophoresis unit (Bio-Rad®, USA). Samples were dissolved in a 1:2 (v/v) ratio in a buffer solution: SDS (20 % w/v), glycerol (2.5 % v/v),  $\beta$ -mercaptoethanol (1.0 % v/v), and bromophenol blue (0.02 % w/v). Resolving gel (pH 8.8) consisted of SDS (0.21 % w/v), and acrylamide (20 % w/v). Stacking gel (pH 6.8) was made up of SDS (0.21 % w/v) and acrylamide (5 % w/v). The total gel thickness was 0.75 mm, with 10 cm of resolving gel and 2 cm of stacking gel. Protein bands were stained by gel immersion in Coomassie brilliant blue R-250 (Cat. 161-0400, Bio-Rad®) in a solution of 400 mL of methanol, 70 mL of acetic acid and 530 mL of DDW (Hernández-Álvarez et al., 2013). Broad-range protein MW standards in the range from 7.1 to 103 kDa (Cat. 161-0303, Bio-Rad®) were used.

## Antioxidant and ACE-inhibitory activities

The antioxidant and ACE-inhibitory activities of the proteins and their hydrolysates were determined at selected times. DPPH free radical scavenging activity was determined as described by Cheison, Wang, and Xu (2007) with slight modifications. Five serial dilutions (0 - 6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of protein) were dissolved in 0.05 M sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). Aliquots of 500  $\mu\text{L}$  were mixed with 1.5 mL of DPPH (0.08 mM) in methanol (80 % v/v), allowed to stand (in dark) at room temperature for 60 min, and the reduction of the DPPH radical was measured at 517 nm (UV-160, Shimadzu®, Japan). The buffer was used as blank.

las muestras se retiraron antes de calentarlas a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los hidrolizados F y L se codificaron como  $\text{FS}_F$  y  $\text{FS}_L$ , respectivamente.

## Grado de hidrólisis

El porcentaje de GH se calculó determinando los grupos amino libres mediante la reacción con TNBS, para lo cual se utilizó un estándar de leucina (Addler-Nissen, 1979). El número total de grupos amino se determinó en una muestra hidrolizada al 100 % tratada con HCl 6 N a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24 h en un horno al vacío (Memmert, EUA).

## Actividad de proteasa fúngica

La actividad de la proteasa fúngica en hidrolizados de FS se determinó de acuerdo con el método reportado por Hernández-Martínez et al. (2011), con ligeras modificaciones. De manera breve, la mezcla de reacción consistió en 570  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía caseína de grado Hammerstein ( $0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7) preincubada a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min, y 30  $\mu\text{L}$  de hidrolizado de FS. La reacción enzimática se realizó durante 15 min y se detuvo añadiendo 0.9 mL de ácido tricloroacético (ATC;  $0.050 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La mezcla se centrifugó a 10000 g durante 15 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se filtró. Los péptidos solubles en el ATC se estimaron por el método de Lowry modificado. La unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 0.01 en la absorbancia a 750 nm bajo las condiciones de ensayo (Soares-de Castro & Sato, 2014). La actividad enzimática se expresó en U por gramo de materia seca ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Castañeda-Casasola et al., 2018).

## Electroforesis

La distribución de PM de las PN y sus hidrolizados se determinó por electroforesis en geles de poliácridamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), como lo reporta Laemmli (1970), empleando la unidad de electroforesis en gel Mini-Protean 2 (Bio-Rad®, EUA). Las muestras se disolvieron en una proporción 1:2 (v/v) en una solución amortiguadora: SDS (20 % p/v), glicerol (2.5 % v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (1.0 % v/v) y azul de bromofenol (0.02 % p/v). El gel de separación (pH 8.8) estuvo constituido por SDS (0.21 % p/v) y acrilamida (20 % p/v), mientras que el gel de concentración (pH 6.8) estuvo conformado por SDS (0.21 % p/v) y acrilamida (5 % p/v). El grosor total del gel fue de 0.75 mm, con 10 cm de gel de separación y 2 cm de gel de concentración. Las bandas de proteínas se revelaron por inmersión del gel en azul brillante Coomassie R-250 (Cat. 161-0400, Bio-Rad®), contenido en una solución de 400 mL de metanol, 70 mL

Antioxidant activity was expressed as the 50 % inhibition percentage ( $IC_{50}$ ) of the free radical DPPH, and calculated by regression analysis of DPPH inhibition (%) versus hydrolysate protein concentration ( $mg \cdot mL^{-1}$ ).

The ACE-inhibitory activity assay was performed using the method reported by Cushman and Cheung (1971), with slight modifications. The reaction mixture contained 5 mM of hippuryl-L-histidyl-L-leucine as substrate, 0.3 M NaCl and 2 mU of enzyme in 50 mM sodium borate buffer (pH 8.3). A sample (100  $\mu$ L) was added to reaction mixture (200  $\mu$ L) and incubated at 37 °C for 45 min. The reaction was stopped by the addition of 1.0 N HCl (300  $\mu$ L). Then 1 mL of ethyl acetate was added to the mixture, vortexed (30 s) and centrifuged at 6000 g (4 °C, 10 min). The upper layer (750  $\mu$ L) was transferred into a glass tube and evaporated at room temperature for 2 h in vacuum. The hippuric acid was re-dissolved in 1.6 mL of DDW, and absorbance was measured at 228 nm. The  $IC_{50}$  value was determined by regression analysis of ACE inhibition (%) versus hydrolysate protein concentration (0 to 15  $mg \cdot mL^{-1}$ ) of serial dilutions.

#### ***In vitro* gastrointestinal digestion**

Simulated gastrointestinal digestion was carried out by sequential pepsin and pancreatin action on the hydrolysates according to the method reported by Ketnawa, Martínez-Alvarez, Benjakul, and Rawdkuen (2016) with slight modifications. Freeze dried hydrolysates were resolubilized (3 % w/v) in DDW, adjusted to pH 2.0 with 1 N HCl, and added with pepsin (4 % w/w of protein). The mixture was incubated at 37 °C for 2 h. The pH was then adjusted to 7.5 with 1 N NaOH, and pancreatin was added (10 % w/w of protein). The resulting mixture was incubated at 37 °C for 2 h, and afterwards digestion was stopped by keeping the test tubes in boiling water for 10 min. The mixtures were cooled at room temperature and centrifuged at 10000 g for 15 min. The supernatants were lyophilized, kept in plastic tubes and stored at -20 °C before antioxidant and ACE-inhibitory activities determination.

#### **Data analysis**

The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Analyzes were carried out in triplicate from three independent experiments. One-way analyses of variance were performed to evaluate the chemical composition of flours and the characteristics of hydrolysates, and Tukey ( $P \leq 0.05$ ) means comparison tests were performed. The SPSS statistical program (SPSS Inc., USA) was used for these tests.

de ácido acético y 530 mL de ADD (Hernández-Álvarez et al., 2013). Se utilizaron estándares de PM de proteínas en un rango de 7.1 a 103 kDa (Cat. 161-0303, Bio-Rad®).

#### **Actividades antioxidante e inhibitoria de ECA**

Se determinaron las actividades antioxidante e inhibitoria de ECA de las proteínas y sus hidrolizados en diferentes momentos. La actividad de captación de radical libre DPPH se determinó de acuerdo con el método descrito por Cheison, Wang, y Xu (2007), con ligeras modificaciones. Se disolvieron cinco diluciones en serie (0 a 6  $mg \cdot mL^{-1}$  de proteína) en una solución amortiguadora de carbonato de sodio/bicarbonato 0.05 M (pH 9.6). Se mezclaron alícuotas de 500  $\mu$ L con 1.5 mL de DPPH (0.08 mM) en metanol (80 % v/v), se dejaron reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 60 min y se midió la reducción del radical DPPH a 517 nm (UV-160, Shimadzu®, Japón). Como blanco se utilizó el amortiguador.

La actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición del 50 % ( $CI_{50}$ ) del radical libre DPPH, y se calculó mediante un análisis de regresión de inhibición de DPPH (%) frente a la concentración de proteína hidrolizada ( $mg \cdot mL^{-1}$ ).

El ensayo de la actividad inhibitoria de ECA se realizó con el método reportado por Cushman y Cheung (1971), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción se constituyó por 5 mM de hipuril-L-histidil-L-leucina como sustrato, NaCl 0.3 M y 2 mU de enzima en amortiguador de borato sódico 50 mM (pH 8.3). Se añadió una muestra de 100  $\mu$ L a la mezcla de reacción (200  $\mu$ L) y se incubó a 37 °C durante 45 min. La reacción se detuvo con la adición de 300  $\mu$ L de HCl 1.0 N. Posteriormente, se añadió a la mezcla 1 mL de acetato de etilo, se agitó en un vórtex (30 s) y se centrifugó a 6000 g por 10 min a 4 °C. La capa superior (750  $\mu$ L) se transfirió a un tubo de vidrio y se evaporó al vacío a temperatura ambiente durante 2 h. El ácido hipúrico se redisolvió en 1.6 mL de ADD, y se midió la absorbancia a 228 nm. El valor  $CI_{50}$  se determinó mediante un análisis de regresión de inhibición de ECA (%) contra la concentración de proteína hidrolizada (0 a 15  $mg \cdot mL^{-1}$ ) de las diluciones en serie.

#### **Digestión gastrointestinal *in vitro***

La digestión gastrointestinal simulada se llevó a cabo mediante la acción secuencial de pepsina y pancreatina sobre los hidrolizados de acuerdo con el método reportado por Ketnawa, Martínez-Alvarez, Benjakul, y Rawdkuen (2016), con ligeras modificaciones. Los hidrolizados liofilizados se solubilizaron (3 % p/v) en

## Results and discussion

### Proximate chemical composition of seed flours

Moisture, protein, carbohydrates, and ash contents were significantly different for the L and F seed flours. F had higher protein content than L (Table 1). Olukomaiya et al. (2020) reported higher protein (35.77 %) and fat (6.05 %) contents for *L. angustifolius* L. flour. Relatively high protein contents in mature seeds are due to protein accumulation throughout their development, varying slightly depending on plant species, variety, maturity and growing conditions.

### Protein extraction

Protein extraction is affected by pH, which influences the ratio of free to neutralized charges (Alshaimy et al., 2007). The pH values  $\geq 8$  promote tannin-protein dissociation which hampers the enzymatic reaction (Guang & Phillips, 2009). In this work, it was found that the use of alkaline solutions at pH 12 produced solubilized protein yields of  $87.7 \pm 0.9$  % for L and  $94.9 \pm 2.8$  % for F.

### Degree of hydrolysis and protease activity

The extent of seed proteins hydrolysis was monitored using the DH percentage, which is defined as the percentage of the total number of peptide bonds in a protein which has been cleaved during hydrolysis (Addler-Nissen, 1979). The EH curves of F and L proteins were characterized by an initial pronounced increased in DH values (up to approximately 1 h) (Figure 1). Afterwards the hydrolysis rate decreased (around 2-6 h) and finally approached to a quasi-stationary state, where very slow hydrolysis occurred possible due to exhaustion of the substrate, enzyme inhibition by products or autolysis (Kristinsson & Rasco, 2000).

ADD, se ajustó el pH de la solución a 2 con HCl 1 N y se agregó pepsina (4 % p/p de proteína). La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 h; después, se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1 N y se añadió pancreatina (10 % p/p de proteína). La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 2 h, y posteriormente se detuvo la digestión manteniendo los tubos en agua hirviendo durante 10 min. Las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se liofilizaron, se mantuvieron en tubos de plástico y se almacenaron a -20 °C antes de determinar las actividades antioxidante e inhibitoria de ECA.

### Análisis de datos

Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Los análisis se realizaron por triplicado a partir de tres experimentos independientes. Se realizaron análisis de varianza de una sola vía para evaluar la composición química de las harinas y las características de los hidrolizados, y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Para dichas pruebas se utilizó el programa estadístico SPSS (SPSS Inc., EUA).

## Resultados y discusión

### Composición química proximal de las harinas de semillas

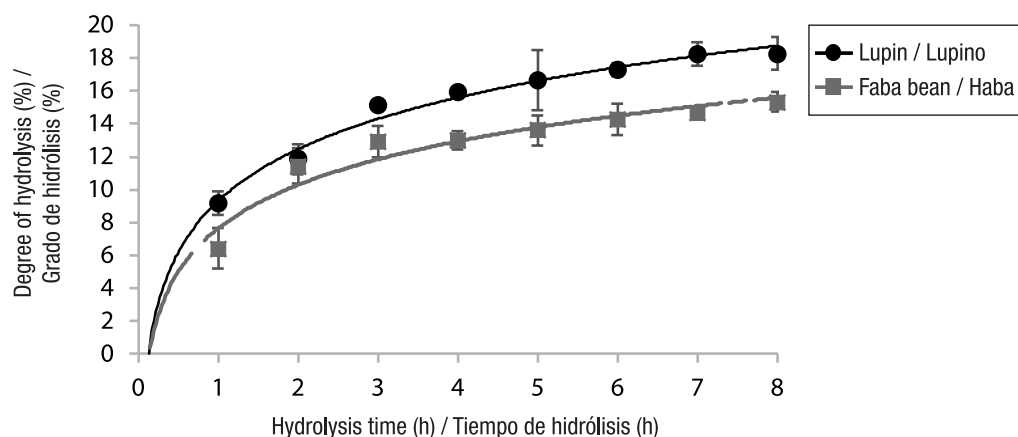
El contenido de humedad, proteína, carbohidratos y cenizas fue significativamente diferente para las harinas de semillas de L y F. La segunda tuvo mayor contenido de proteína que L (Cuadro 1). Olukomaiya et al. (2020) obtuvieron un mayor contenido de proteína (35.77 %) y grasa (6.05 %) en la harina de *L. angustifolius* L. Los contenidos relativamente altos de proteína en semillas maduras se deben a la acumulación de proteína a lo largo de su desarrollo,

**Table 1. Chemical proximate composition of lupin and faba bean seed flours (g·100 g<sup>-1</sup> dry basis).  
Cuadro 1. Composición química proximal de la harina de semillas de lupino y haba (g·100 g<sup>-1</sup> en base seca).**

Chemical composition / Composición química	Seed / Semilla	
	Lupin / Lupino	Faba bean / Haba
Protein / Proteína	22.2 $\pm$ 2.0 a <sup>2</sup>	30.0 $\pm$ 1.0 b
Fat / Grasa	1.4 $\pm$ 0.6 a	1.6 $\pm$ 0.1 a
Carbohydrates / Carbohidratos	58.6 $\pm$ 4.6 b	50.2 $\pm$ 2.1 a
Fiber / Fibra	15.0 $\pm$ 2.0 a	14.9 $\pm$ 0.1 a
Ash / Cenizas	2.8 $\pm$ 0.1 a	3.3 $\pm$ 0.3 b

<sup>2</sup>Means with the same letter within each row are not statistically different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>2</sup>Medias con la misma letra entre cada fila no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figure 1. Degree of hydrolysis of lupin (L) and faba bean (F) proteins by Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L (125 LAPU·g<sub>protein</sub><sup>-1</sup>, 50 °C, pH 7).**

**Figura 1. Grado de hidrólisis de proteínas de lupino (L) y haba (F) mediante Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L (125 LAPU·g<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, 50 °C, pH 7).**

This typical EH profile has been also reported for proteins from mung-bean and black bean var. Jamapa (Hernández-Álvarez et al., 2013; Hong, Wei, Liu, & Hui, 2005).

The DH values obtained after 6 h of EH were of  $15.3 \pm 0.2$  % for F and of  $18.3 \pm 1.0$  % for L. The DH percentage obtained for faba bean protein was higher than that reported for faba bean protein hydrolyzed with Flavourzyme during 1 h (Eckert et al., 2019). The different DH values shown by the seeds could be due to the differences in their storage protein profile, and the secondary and tertiary protein structures, which influenced their susceptibility to proteolysis (Hernández-Álvarez et al., 2013).

Protease production by SF was assessed with F and L flours as substrates for *A. niger*. The results showed an inconsistent pattern of protease production over the course of fermentation of both seeds. Figure 2 shows increasing levels of enzymatic activity up to 2 days reaching values of  $37.03 \pm 0.97$  U·g<sup>-1</sup> for F and  $128.90 \pm 17.75$  U·g<sup>-1</sup> for L. Afterwards protease production decreased during the following 3 to 4 days, but for the case of L a new increase of enzymatic activity was observed at 5 days. The DH values obtained after 6 days of fermentation were  $6.9 \pm 0.1$  % for F and  $8.6 \pm 0.2$  % for L.

Novelli, Barros, and Fleuri (2016) reported that differences in protease production by SF might depend on either the type of substrate or the fungal strain. They also reported that similar protease production for more than one fermentation time could occur, and that the variations in proteolytic activity with fermentation time could reflect underlying adaptations in the molecular and physiological machinery of a particular strain for a given substrate. In the particular

la cual varía ligeramente según la especie vegetal, variedad, madurez y condiciones de crecimiento.

#### Extracción de proteína

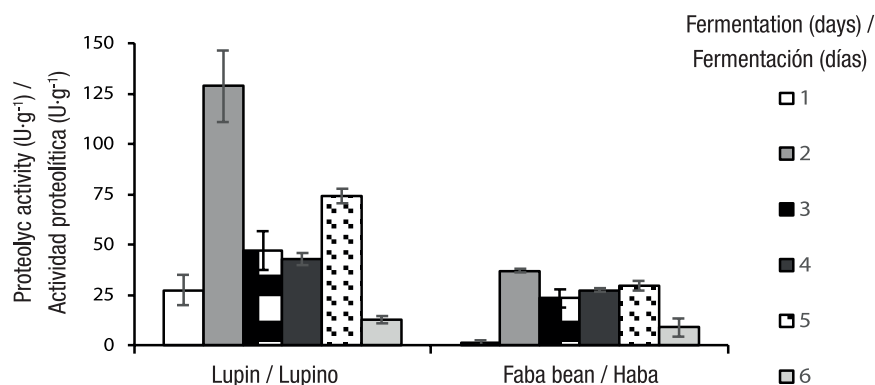
La extracción de proteínas se ve afectada por el pH, que influye en la relación entre cargas libres y neutralizadas (Alsohaimy et al., 2007). Los valores de  $\text{pH} \geq 8$  promueven la disociación tanino-proteína, lo que dificulta la reacción enzimática (Guang & Phillips, 2009). En este trabajo, se comprobó que el uso de soluciones alcalinas a pH 12 produjo rendimientos de proteínas solubilizadas de  $87.7 \pm 0.9$  % para L y de  $94.9 \pm 2.8$  % para F.

#### Grado de hidrólisis y actividad de la proteasa

La extensión de hidrólisis de proteínas de las semillas evaluadas se monitoreó utilizando el porcentaje de GH, que se define como el porcentaje del número total de enlaces peptídicos en una proteína que se han escindido durante la hidrólisis (Addler-Nissen, 1979). Las curvas de la HE de las proteínas de F y L se caracterizaron por un incremento pronunciado inicial de los valores de GH (hasta aproximadamente 1 h) (Figura 1). Posteriormente, la tasa de hidrólisis disminuyó (alrededor de 2 a 6 h), y finalmente se aproximó a un estado cuasi-estacionario, donde se produjo una hidrólisis muy lenta, posiblemente debido al agotamiento del sustrato, la inhibición enzimática por productos o la autólisis (Kristinsson & Rasco, 2000). Este perfil típico de la HE también se ha reportado para proteínas de frijol mungo y frijol negro var. Jamapa (Hernández-Álvarez et al., 2013; Hong, Wei, Liu, & Hui, 2005).

Los valores de GH obtenidos después de 6 h de HE fueron de  $15.3 \pm 0.2$  % para F y de  $18.3 \pm 1.0$  % para L.





**Figure 2. Influence of the incubation period on protease production by *Aspergillus niger* GH1 under solid state fermentation using lupin and faba bean flours.**

**Figura 2. Influencia del período de incubación sobre la producción de proteasa por *Aspergillus niger* GH1 bajo fermentación en estado sólido de harinas de lupino y haba.**

case of SF by *A. niger*, they found a maximum proteolytic activity for wheat bran after 4 days and for soybean bran after 5 days. Furthermore, the knowledge of the microbial biological mechanisms associated with this process helped to achieve optimal levels of enzyme production by SF. Belmessikh, Boukhalifa, Mechakra-Maza, Gheribi-Aoulmi, and Amrane (2013) found various fermentation times for *A. oryzae* according to the proteolytic activity measured and the substrate used.

On the other hand, Sumantha, Sandhya, Szakacs, Soccol, and Pandey (2005) reported that the drop in enzyme activity with increasing fermentation time could be due to cessation of production, or to inactivation of the proteases by autolysis. Proteases participate in many essential general processes of cells and their regulation. The simplest and most obvious role of microbial proteases is in nutrition where extracellular proteases degrade insoluble proteins and soluble large polypeptides into smaller peptides and amino acids, which are accessible to the cell (Ward, Rao, & Kulkarni, 2009), and stimulate enzyme production (Chutmanop, Chuichulcherm, Chisti, & Srinophakun, 2008).

### Molecular weight distribution

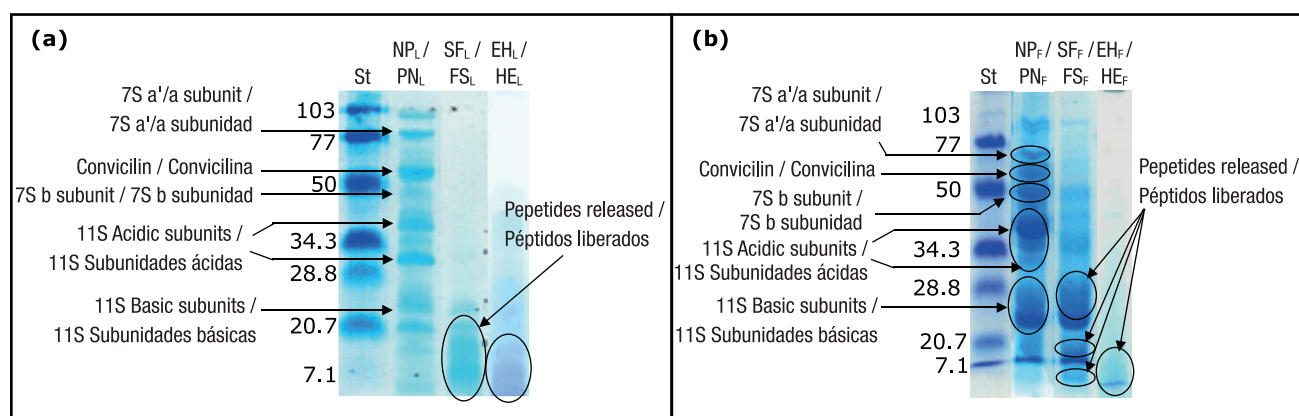
The MW distribution of the NP and hydrolysates was examined by SDS-PAGE (Figure 3). Samples processed for 120 h in the case of SF and for 6 h for EH were analyzed, as longer times did not produce major differences in the polypeptide profiles.

SDS-PAGE of NP of L (NP<sub>L</sub>) and F (NP<sub>F</sub>) (Figures 3a and 3b) showed bands corresponding to  $\alpha'$ / $\alpha$  (~77 kDa) and  $\beta$  (~48 kDa) subunits of 7S ( $\beta$ -conglycinin), convicilin (63 kDa), and acid and basic subunits of 11S globulin (~30-43 kDa and 20-25 kDa, respectively). It has been reported that the bands between 34-37 kDa and 18-25 kDa of faba bean protein correspond to the acidic

El porcentaje de GH obtenido para la proteína de haba fue mayor que el reportado para la proteína de haba hidrolizada con Flavourzyme durante 1 h (Eckert et al., 2019). Los valores diferentes de GH que muestran las semillas analizadas pueden deberse a las diferencias en su perfil proteínico de almacenamiento, y a las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas, que influyeron en su susceptibilidad a la proteólisis (Hernández-Álvarez et al., 2013).

La producción de proteasa por FS se evaluó con harinas de F y L como sustratos para *A. niger*. Los resultados mostraron un patrón inconsistente de producción de proteasa en el transcurso de la fermentación de ambas semillas. En la Figura 2 se muestran niveles crecientes de la actividad enzimática hasta 2 días, alcanzando valores de  $37.03 \pm 0.97$  U·g<sup>-1</sup> para F y  $128.90 \pm 17.75$  U·g<sup>-1</sup> para L. Posteriormente, la producción de proteasa disminuyó durante los siguientes 3 a 4 días, aunque en el caso de L se observó un nuevo aumento de la actividad enzimática a los 5 días. Los valores de GH obtenidos después de 6 días de fermentación fueron de  $6.9 \pm 0.1$  % para F y  $8.6 \pm 0.2$  % para L.

Novelli, Barros, y Fleuri (2016) sugieren que las diferencias en la producción de proteasa por FS podrían depender del tipo de sustrato o de la cepa fúngica. Asimismo, señalan que es posible que ocurra una producción de proteasa similar durante más de un tiempo de fermentación, y que las variaciones de la actividad proteolítica con el tiempo de fermentación podían reflejar adaptaciones subyacentes en la maquinaria molecular y fisiológica de una cepa particular para un sustrato determinado. En el caso particular de la FS por *A. niger*, dichos autores encontraron una actividad proteolítica máxima para salvado de trigo después de 4 días, y para salvado de soya después de 5 días. Además, conocer los mecanismos biológicos microbianos asociados con este



**Figure 3. SDS-PAGE of native protein (NP), fermented protein hydrolysates (SF) and enzymatic protein hydrolysates (EH) of: a) lupin (L) and b) faba bean (F). Lane St: MW standards (kDa).**

**Figura 3. SDS-PAGE de proteína nativa (PN), hidrolizados de proteínas fermentadas en sólido (FS) e hidrolizados enzimáticos de proteínas (HE) de: a) lupino (L) y b) haba (F). Línea St: Estándares de PM (kDa).**

and basic subunits of the 11S fraction, respectively (Eckert et al., 2019). Also low MW (< 20.7 kDa) bands can be observed that could be due to a mixture of albumin polypeptides,  $\gamma$ -vicilin or polypeptides from the post-translational cleavage of the storage proteins (Barbana & Boye, 2010).

SF<sub>L</sub> showed the disappearance of the bands corresponding to  $\beta$ -conglycinin, convicilin and acid subunits of 11S globulin by the proteolytic action of the proteases produced by *A. niger*, and released peptides exhibiting MW's lower than 20.7 kDa (Figure 3a). Meanwhile EH<sub>L</sub> presented disappearance of the bands corresponding to  $\alpha'$ / $\alpha$  subunits of 7S ( $\beta$ -conglycinin) and convicilin, and the production of peptides with predominantly MW's at  $\leq 7.1$  kDa. SF<sub>F</sub> (Figure 3b) displayed decreases in the intensity of the major proteins bands and the appearance of bands corresponding to peptides with MW's around of 40, 28.8, 20.7, and lower than 7.1 kDa. The basic subunits of 11S globulin were resistant to hydrolysis by *A. niger* proteases. On the other hand, EH<sub>F</sub> (Figure 3b) showed mainly peptides of MW's < 7.1 kDa, so it may be inferred that EH was more efficient than SF.

### Antioxidant and ACE-inhibitory activities

DPPH is a stable free radical and shows maximum absorbance at 517 nm in methanol. When DPPH encounters a proton-donating substance such as an antioxidant, the radical would be scavenged and the absorbance is reduced. Therefore, DPPH is widely used to evaluate the free radical scavenging activity of natural antioxidants (Wang, Le, Shi, & Zeng, 2014).

NP<sub>L</sub> and NP<sub>F</sub> did not show free radical scavenging ability, while all the hydrolysates showed antioxidant

proceso ayudó a lograr niveles óptimos de producción de enzimas por medio de la FS. Belmessikh, Boukhalifa, Mechakra-Maza, Gheribi-Aoulmi, y Amrane (2013) encontraron varios tiempos de fermentación para *A. oryzae* de acuerdo con la actividad proteolítica medida y el sustrato utilizado.

Por otro lado, Sumantha, Sandhya, Szakacs, Soccol, y Pandey (2005) indican que la disminución de la actividad enzimática al aumentar el tiempo de fermentación podría deberse al cese de producción o inactivación de proteasas por autólisis. Las proteasas participan en muchos procesos generales esenciales de las células, así como en su regulación. La función más simple y obvia de las proteasas microbianas es la nutrición, ya que las proteasas extracelulares degradan las proteínas insolubles y los grandes polipéptidos solubles en péptidos más pequeños y aminoácidos, que son accesibles a la célula (Ward, Rao, & Kulkarni, 2009) y estimulan la producción de enzimas (Chutmanop, Chuichulcherm, Chisti, & Srinophakun, 2008).

### Distribución del peso molecular

La distribución del PM de las PN e hidrolizados se examinó por el método SDS-PAGE (Figura 3). Se analizaron muestras procesadas durante 120 h en el caso de FS y 6 h para HE, ya que los tiempos más largos no produjeron grandes diferencias en los perfiles de los polipéptidos.

Los SDS-PAGE de las PN de L (NP<sub>L</sub>) y F (NP<sub>F</sub>) (Figuras 3a y b) mostraron bandas correspondientes a las subunidades  $\alpha'$ / $\alpha$  (~77 kDa) y  $\beta$  (~48 kDa) de 7S ( $\beta$ -conglycinina), convicilina (63 kDa), y subunidades ácidas y básicas de globulina 11S (~30-43 kDa y 20-25 kDa, respectivamente). Se ha reportado que las

activity (Table 2). EH<sub>L</sub> showed a significantly higher antioxidant activity than the rest of the hydrolysates, which were non-significant different among themselves (Table 2). These results indicate that antioxidant activity was not directly related to the DH value or to the MW of the hydrolysates. Jakubczyk et al. (2019) indicated that not only short peptides consisting in lower than 20 amino acids present biological activity. Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto, and Nokihara (1998) concluded that the antioxidant properties of peptides are more related to their composition, structure, and hydrophobicity.

The antioxidant properties of peptides have been attributed to the presence of certain amino acids (His, Tyr, Trp, Met, Lys, Cys) and to their correct positioning in peptide sequence (Sarmadi & Ismail, 2010). Hydrolysis may increase or decrease the hydrophobicity of the peptides depending on the nature of the precursor protein and MW of the generated peptides (Calderón-de la Barca, Ruiz-Salazar, & Jaramarini, 2000). Erdmann, Cheung, and Schröder (2008) attributed the antioxidant activity of peptides to high concentrations of histidine and hydrophobic amino acids, with Pro-His-His sequences. DPPH IC<sub>50</sub> values of our hydrolysates were significantly lower than those for cotton seed peptides reported by Sun et al. (2014) and wheat germ peptides obtained by Niu, Jiang, y Pan (2013).

Only the EH<sub>L</sub> (2.39 mg·mL<sup>-1</sup>) and SF<sub>L</sub> (14.08 mg·mL<sup>-1</sup>) hydrolysates undigested presented ACE-inhibitory activity (Table 2). EH<sub>F</sub> and SF<sub>F</sub> presented lower values of DH than EH<sub>L</sub> and SF<sub>L</sub>. It has been informed a positive correlation between the inhibitory capacity of the ACE and the DH (Fajardo-Espinoza, Romero-Rojas, & Hernández-Sánchez, 2020). The IC<sub>50</sub> values of

bandas entre 34-37 kDa y 18-25 kDa de proteínas de haba corresponden a las subunidades ácidas y básicas de la fracción 11S, respectivamente (Eckert et al., 2019). En la misma figura se observan bandas de bajo PM (< 20.7 kDa) que podrían deberse a una mezcla de polipéptidos de albúmina,  $\gamma$ -vicilina o polipéptidos de la ruptura post-translacional de proteínas de almacenamiento (Barbana & Boye, 2010).

FS<sub>L</sub> mostró la desaparición de las bandas correspondientes a  $\beta$ -conglucina, convicilina y subunidades ácidas de globulina 11S por la acción proteolítica de proteasas producidas por *A. niger*, así como de péptidos liberados con PM inferiores a 20.7 kDa (Figura 3a). Por su parte, la HE<sub>L</sub> presentó la desaparición de las bandas correspondientes a las subunidades  $\alpha'$ / $\alpha$  de 7S ( $\beta$ -conglucina) y convicilina, y la producción de péptidos con PM predominantes  $\leq$  7.1 kDa. FS<sub>F</sub> (Figura 3b) tuvo disminuciones en la intensidad de bandas de las principales proteínas, y la aparición de bandas correspondientes a péptidos con PM alrededor de 40, 28.8, 20.7, y menores a 7.1 kDa. Las subunidades básicas de globulina 11S fueron resistentes a la hidrólisis de proteasas por *A. niger*. Por otro lado, HE<sub>F</sub> (Figura 3b) mostró principalmente péptidos de PM < 7.1 kDa, por lo que se puede inferir que HE fue más eficiente que FS.

#### Actividades antioxidante e inhibitoria de ECA

DPPH es un radical libre estable que muestra su máxima absorbancia a 517 nm en metanol. Cuando DPPH se encuentra con una sustancia donadora de protones, como un antioxidante, el radical es eliminado y la absorbancia se reduce. Por lo tanto, DPPH se utiliza ampliamente para evaluar la actividad de eliminación de radicales libres de antioxidantes naturales (Wang, Le, Shi, & Zeng, 2014).

**Table 2. Antioxidant and ACE-inhibition activities of the lupin (L) and faba bean (F) protein hydrolysates before and after *in vitro* gastrointestinal digestion.**

**Cuadro 2. Actividades antioxidante e inhibitoria de ECA de hidrolizados proteínicos de lupino (L) y haba (F) antes y después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.**

Hydrolyzate type / Tipo de hidrolizado	Undigested / Sin digerir	Digested / Digerido	Undigested / Sin digerir	Digested / Digerido
	DPPH IC <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> ) / DPPH CI <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> )		ACE IC <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> ) / ECA CI <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> )	
EH <sub>L</sub> /HE <sub>L</sub>	1.23 ± 0.02 a <sup>2</sup>	4.76 ± 0.10 b	2.39 ± 0.10 a	8.14 ± 0.53 a
SF <sub>L</sub> /FS <sub>L</sub>	1.97 ± 0.11 b	33.86 ± 4.36 d	14.08 ± 2.21 b	12.25 ± 1.09 b
EH <sub>F</sub> /HE <sub>F</sub>	2.04 ± 0.10 b	5.49 ± 0.06 b	nd	12.58 ± 0.99 b
SF <sub>F</sub> /FS <sub>F</sub>	2.08 ± 0.03 b	9.60 ± 0.04 c	nd	7.48 ± 1.15 a

IC = 50 % inhibition; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ACE = angiotensin converting enzyme; EH = enzymatic hydrolysis; SF = solid-state fermentation hydrolysis; nd = undetected. <sup>2</sup>Means with the same letter within each column are not statistically different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CI<sub>50</sub> = 50 % de inhibición; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ECA = enzima convertidora de angiotensina; HE = hidrólisis enzimática; FS = hidrólisis por fermentación en estado sólido; nd = no detectado. <sup>2</sup>Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

EH<sub>L</sub> and SF<sub>L</sub> were higher than those of hydrolysates of *L. albus* and *L. angustifolius* (0.226-0.268 mg·mL<sup>-1</sup>) obtained by Boschin, Scigliuolo, Resta, and Arnoldi (2014) with pepsin, probably due to in this last case the ACE-inhibitory peptides were separated by membrane filtration.

Liu, Chen, and Lin (2005) reported that tripeptides composed of amino acids with strong hydrophobicity at their C- and N-terminal had potent ACE-inhibitory activity. Arnoldi, Boschin, Zanoni, and Lammi (2015) observed IC<sub>50</sub> values of protein hydrolysates of *L. albus*, *L. angustifolius* and *L. luteus* obtained with different enzymes between 0.136-1.053 mg·mL<sup>-1</sup>.

The comparison of ACE IC<sub>50</sub> values obtained by different authors is a complex task, since the observed differences in the ACE-inhibitory activity may be related to various factors, such as the protein extraction procedure, peptide mixture composition, hydrolysis parameters, hydrolysis agent, analytical method for determining ACE-inhibitory activity, among others (Chin et al., 2019).

#### **In vitro gastrointestinal digestion**

The resistance of bioactive peptides against gastrointestinal proteases is a pre-requisite for their action *in vivo* and potential use as functional ingredients. Peptides resistant to gastrointestinal digestion can be absorbed in their intact form through the intestine to reach their target sites (Hannelore, 2004). Hence, the importance of evaluating the resistance of hydrolysates obtained against digestive enzymes.

After digestion all the hydrolysates showed DH percentage increases as follows: 12.7 ± 1.3 % for EH<sub>L</sub>, 3.2 ± 0.4 % for SF<sub>L</sub>, 5.6 ± 1.4 % for EH<sub>F</sub> and 7.5 ± 1.9 % for SF<sub>F</sub>. These results suggested differences in the susceptibility of the hydrolysates to digestive enzymes, and caused modifications in their antioxidant and ACE-inhibitory activities (Table 2). Significant antioxidant activity reductions were observed in the digested hydrolysates, which showed higher DPPH IC<sub>50</sub> values. Girgih et al. (2015) reported that non-fractionated hydrolysates show a greater antioxidant activity due to a synergistic effect between peptides of different MWs.

ACE-inhibitory activity of the digested EH<sub>L</sub> was significantly lower than that before digestion, while that of SF<sub>L</sub> remained without significant changes.

#### **Conclusions**

Lupin hydrolysates exhibited antioxidant and ACE-inhibitory activities, while the native protein did not

PN<sub>L</sub> y PN<sub>F</sub> no mostraron capacidad de eliminación o captación de radicales libres, mientras que todos los hidrolizados mostraron actividad antioxidante (Cuadro 2). HE<sub>L</sub> mostró actividad antioxidante significativamente más alta que el resto de los hidrolizados, los cuales no fueron significativamente diferente entre sí (Cuadro 2). Estos resultados indican que la actividad antioxidante no estuvo directamente relacionada con el valor de GH o con el PM de los hidrolizados. Jakubczyk et al. (2019) mencionan que no sólo los péptidos cortos que contienen menos de 20 aminoácidos presentan actividad biológica. Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto, y Nokihara (1998) concluyeron que las propiedades antioxidantes de los péptidos están más relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad.

Las propiedades antioxidantes de los péptidos se han atribuido a la presencia de ciertos aminoácidos (His, Tyr, Trp, Met, Lys, Cys), y a su correcto posicionamiento en la secuencia peptídica (Sarmadi & Ismail, 2010). La hidrólisis puede aumentar o disminuir la hidrofobicidad de péptidos en función de la naturaleza de la proteína precursora y el PM de los péptidos generados (Calderón-de la Barca, Ruiz-Salazar, & Jaramarini, 2000). Erdmann, Cheung, y Schröder (2008) atribuyen la actividad antioxidante de los péptidos a las altas concentraciones de histidina y aminoácidos hidrofóbicos, con secuencias de Pro-His-His. Los valores de DPPH CI<sub>50</sub> de los hidrolizados de este estudio fueron significativamente menores que los péptidos de semillas de algodón reportados por Sun et al. (2014), y los péptidos del germen de trigo obtenidos por Niu, Jiang, y Pan (2013).

Únicamente los hidrolizados HE<sub>L</sub> (2.39 mg·mL<sup>-1</sup>) y FS<sub>L</sub> (14.08 mg·mL<sup>-1</sup>) sin digerir presentaron actividad inhibitoria de ECA (Cuadro 2). HE<sub>F</sub> y FS<sub>F</sub> presentaron valores menores del GH que HE<sub>L</sub> y FS<sub>L</sub>. Se ha informado que existe una correlación positiva entre la capacidad inhibitoria de ECA y el GH (Fajardo-Espinoza, Romero-Rojas, & Hernández-Sánchez, 2020). Los valores CI<sub>50</sub> de HE<sub>L</sub> y FS<sub>L</sub> fueron superiores a los de los hidrolizados de *L. albus* y *L. angustifolius* (0.226-0.268 mg·mL<sup>-1</sup>) obtenidos por Boschin, Scigliuolo, Resta, y Arnoldi (2014) con pepsina, probablemente debido a que en este último caso los péptidos inhibidores de ECA se separaron por filtración de membrana.

Liu, Chen, y Lin (2005) mencionan que los tripéptidos compuestos de aminoácidos con una fuerte hidrofobicidad en su C y N terminales tuvieron una potente actividad inhibitoria de ECA. Arnoldi, Boschin, Zanoni, y Lammi (2015) observaron valores de CI<sub>50</sub> de hidrolizados proteínicos de *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, obtenidos con diferentes enzimas, entre 0.136 y 1.053 mg·mL<sup>-1</sup>. La comparación de los valores de ECA CI<sub>50</sub> obtenidos por diferentes autores es una tarea compleja, ya que las diferencias observadas en la actividad

exhibit neither of these activities. The enzymatic hydrolysis of lupin protein by Flavourzyme yielded hydrolysates with higher biological activities than those produced by solid-state fermentation by *A. niger*. faba bean hydrolysates only exhibited antioxidant activity.

The *in vitro* evaluation of the lupin and faba bean protein hydrolysates against digestive enzymes indicated that the antioxidant activity diminished for both, while the ACE-inhibitory activity decreased for the lupin enzymatic hydrolysate, but remained without changes for fermented lupin hydrolysate. Therefore, it can be said that EH and SF improve the health-promoting properties of native bean and lupine proteins; however, more research is needed to determine the relationship between structure and activity of these protein hydrolysates.

#### End of English version

#### References / Referencias

- Addler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. doi: 10.1021/jf60226a042
- Alsohaimy, S. A., Sitohy, M. Z., & El-Masry, R. A. (2007). Isolation and partial characterization of chickpea, lupin and lentil seed proteins. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 123-129. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/234027219\\_Isolation\\_and\\_Partial\\_Characterization\\_of\\_Chickpea\\_lupine\\_and\\_Lentil\\_seed\\_proteins](https://www.researchgate.net/publication/234027219_Isolation_and_Partial_Characterization_of_Chickpea_lupine_and_Lentil_seed_proteins)
- Aluko, R. E. (2019). Food protein-derived renin-inhibitory peptides: *In vitro* and *in vivo* properties. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), 1-12. doi: 10.1111/jfbc.12648
- Arnoldi, A., Boschini, G., Zanoni, C., & Lammi, C. (2015). The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. *Journal of Functional Foods*, 18(A), 550-563. doi: 10.1016/j.jff.2015.08.012
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Methods of Analysis*. Arlington: Author.
- Ayyash, M., Johnson, S. K., Liu, S. Q., Al-Mheiri, N., & Abushelaibi, A. (2018). Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by *Bifidobacterium* species: *In-vitro* investigations. *LWY-Food Science and Technology*, 95, 295-302. doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.099
- Ayyash, M., Johnson, S. K., Liu, S. Q., Mesmari, N., Dahmani, S., Al Dhaheri, A. S., & Kizhakkayil, J. (2019). *In vitro* investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp. *Food Chemistry*, 275, 50-58. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.031

inhibitoria de ECA pueden estar relacionadas con diversos factores, como el método de extracción de la proteína, composición de la mezcla de péptidos, parámetros de la hidrólisis, agente de hidrólisis, método analítico para determinar la actividad inhibitoria de ECA, entre otros (Chin et al., 2019).

#### Digestión gastrointestinal *in vitro*

La resistencia de péptidos bioactivos contra proteasas gastrointestinales es un requisito previo para su acción *in vivo* y su posible uso como ingredientes funcionales. Los péptidos resistentes a la digestión gastrointestinal pueden ser absorbidos en su forma intacta a través del intestino para llegar a sus sitios de destino (Hannelore, 2004); de ahí la importancia de evaluar la resistencia de los hidrolizados obtenidos contra enzimas digestivas.

Después de la digestión, todos los hidrolizados mostraron incremento en el GH de la siguiente manera:  $12.7 \pm 1.3$  % para HE<sub>L</sub>,  $3.2 \pm 0.4$  % para FS<sub>L</sub>,  $5.6 \pm 1.4$  % para HE<sub>F</sub> y  $7.5 \pm 1.9$  % para FS<sub>F</sub>. Estos resultados sugieren diferencias en la susceptibilidad de los hidrolizados a las enzimas digestivas, y provocaron modificaciones en sus actividades antioxidante e inhibitoria de la ECA (Cuadro 2). Se observaron reducciones significativas de la actividad antioxidante en hidrolizados digeridos, ya que mostraron valores más altos de DPPH de CI<sub>50</sub>. Girgih et al. (2015) indican que los hidrolizados no fraccionados muestran una mayor actividad antioxidante debido a un efecto sinérgico entre los péptidos de diferentes PM.

La actividad inhibitoria de ECA por HE<sub>L</sub> digerido fue significativamente menor que antes de la digestión, mientras que la de FS<sub>L</sub> permaneció sin cambios significativos.

#### Conclusiones

Los hidrolizados de lupino exhibieron actividades antioxidante e inhibitoria de ECA, mientras que la proteína nativa no mostró ninguna de estas actividades. La hidrólisis enzimática de la proteína de lupino por Flavourzyme produjo hidrolizados con actividades biológicas más altas que las producidas por fermentación en estado sólido por *A. niger*. Por su parte, los hidrolizados de haba sólo mostraron actividad antioxidante.

La evaluación *in vitro* de los hidrolizados de proteína de lupino y haba con enzimas digestivas indicó que la actividad antioxidante disminuyó para ambos, mientras que la actividad inhibitoria de ECA disminuyó para el hidrolizado enzimático de lupino, pero permaneció sin cambios para el hidrolizado fermentado de lupino. Por lo anterior, se puede decir

- Barbana, C., & Boye, J. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), 1642-1649. doi: 10.1016/j.foodres.2010.05.003
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., & Amrane, A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 377-385. doi: 10.1016/j.jtice.2012.12.011
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.076
- Calderón-de la Barca, A. M., Ruiz-Salazar, R. A., & Jara-Marini, M. E. (2000). Enzymatic hydrolysis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science*, 65(2), 246-253. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb15988.x
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*. 76, 19-30. doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.007
- Castañeda-Casasola, C., Arana-Cuenca, A., Favela-Torres, E., Anducho-Reyes, M. A., González, A. E., & Téllez-Jurado, A. (2018). Xylanase enzymes production by *Aspergillus fumigatus* in solid state fermentation and submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 47-61. doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/CastanedaE
- Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3896-3904. doi: 10.1021/jf062936i
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53. doi: 10.1021/jf970649w
- Chibuike, C. U., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71(1), R11-R24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
- Chin, Y. Y., Chew, L. Y., Toh, G. T., Salampessy, J., Azlan, A., & Ismail, A. (2019). Nutritional composition and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of blue lupin (*Lupinus angustifolius*). *Food Bioscience*, 31, 1-10. doi: 10.1016/j.fbio.2019.04.002
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(7), 1012-1018. doi: 10.1002/jctb.1907
- que HE y FS mejoran las propiedades promotoras de la salud de proteínas nativas de haba y lupino; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para determinar la relación entre estructura y actividad de estos hidrolizados proteínicos.

### Fin de la versión en español

Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648. doi: 10.1016/0006-2952(71)90292-9

Eckert, E., Han, J., Swallow, K., Tian, Z., Jarpa-Parra, M., & Chen, L. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration on physicochemical and functional properties of faba bean protein. *Cereal Chemistry*, 96(4), 725-741. doi: 10.1002/cche.10169

Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.11.010

Fajardo-Espinoza, F. S., Romero-Rojas, A., & Hernández-Sánchez, H. (2020). Production of bioactive peptides from bovine colostrum whey using enzymatic hydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 1-9. doi: 10.24275/rmiq/Alim525

Ferri, M., Serrazanetti, D. I., Tassoni, A., Baldissarri, M., & Gianotti, A. (2016). Improving the functional and sensorial profile of cereal-based fermented foods by selecting *Lactobacillus plantarum* strains via a metabolomics approach. *Food Research International*, 89(3), 1095-1105. doi: 10.1016/j.foodres.2016.08.044

Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652-659. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.079

Guang, C., & Phillips, D. R. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120. doi: 10.1021/jf900494d

Hannelore, D. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 361-384. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149

Hernández-Álvarez, A. J., Carrasco-Castilla, J., Dávila-Ortiz, G., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque-Peña, J., Jacinto-Hernández, C., & Jiménez-Martínez, C. (2013). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity in protein hydrolysates from normal and anthracnose disease-damaged *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 961-966. doi: 10.1002/jsfa.5841

Hernández-Martínez, R., Rojo-Domínguez, A., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C. W., Loera-Corral, O., Huerta-

- Ochoa, S., Regalado-González, C., & Prado-Barragán, L. A. (2011). Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 2001-2006. doi: 10.1016/j.procbio.2011.07.013
- Hong, L. G., Wei, L. G., Liu, H., & Hui, S. Y. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with Alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11(4), 281-287. doi: 10.1177/1082013205056781
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Złotek, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., & Bochnak, J. (2019). Peptides obtained from fermented faba bean seeds (*Vicia faba*) as potential inhibitors of an enzyme involved in the pathogenesis of metabolic syndrome. *LWT - Food Science and Technology*, 105, 306-313. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.009
- Karkouch, I., Tabbenea, O., Gharbia, D., Mloukac, M. A. B., Elkahouia, S., Rihouey, C., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T., & Limam, F. (2017). Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from *Vicia faba* protein hydrolysate: A powerful agents in cosmetic application. *Industrial Crops & Products*, 109, 310-319. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.08.025
- Ketnawa, S., Martínez-Alvarez, O., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2016). Gelatin hydrolysates from farmed giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 192(1), 34-42. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.087
- Kristinsson, G. H., & Raso, A. B. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 131-139. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00195-3
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0
- Lammi, C., Aiello, G., Boschin, G., & Arnoldi, A. (2019). Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 55, 135-145. doi: 10.1016/j.jff.2019.02.016
- Liu, J. R., Chen, M. J., & Lin, C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2467-2474. doi: 10.1021/jf048934k
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F., & Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21120-21135. doi: 10.3390/ijms151121120
- Marques, G. L., Silva, T. P., Lessa, O. A., de Brito, A. R., Reis, N. S., Fernandes, A., Oliveira, J. R., & Franco, M. (2019). Production of xylanase and endoglucanase by solid-state fermentation of jackfruit residue. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(2), 673-680. doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/Marques
- Niu, L. Y., Jiang, S. T., & Pan, L. J. (2013). Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 53-61. doi: 10.1007/s13197-011-0318-z
- Novelli, P. K., Barros, M. M., & Fleuri, L. F. (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 198(1), 119-124. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.089
- Olukomaiya, O. O., Adiamo, O. Q., Fernando, W. C., Mereddy, R., Lic, X., & Sultanbawa, Y. (2020). Effect of solid-state fermentation on proximate composition, anti-nutritional factor, microbiological and functional properties of lupin flour. *Food Chemistry*, 315, 126238. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126238
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-350. doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4
- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432-442. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.002
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.020
- Soares-de Castro, R. J., & Sato, H. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 58-65. doi: 10.1016/j.bcab.2013.11.012i
- Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 313-319. Retrieved from <https://www.ftb.com.hr/archives/83-volume-43-issue-no-4/495-production-and-partial-purification-of-a-neutral-metalloprotease-by-fungal-mixed-substrate-fermentation>
- Sun, H., Yao, X., Wang, X., Wu, Y., Liu, Y., Tang, J., & Feng, J. (2014). Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. *CyTA – Journal of Food*, 13(2), 264-272. doi: 10.1080/19476337.2014.948072
- 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
- Wang, N., Le, G., Shi, Y., & Zeng, Y. (2014). Production of bioactive peptides from soybean meal by solid state fermentation with lactic acid bacteria and protease. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6(9), 1080-1085. doi: 10.19026/ajfst.6.163
- Ward, O. P., Rao, M. B., & Kulkarni, A. (2009). Encyclopedia of microbiology. In: Schaechter, M. (Ed.). *Proteases* (pp. 495-511). Amsterdam: Elsevier.

